

# **APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO: MARCADORES DE GRAVIDADE E DE RESPOSTA À TERAPÊUTICA**

**AMÉLIA MARIA DOS SANTOS FELICIANO**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina**

**na Especialidade de Investigação Clínica**

**na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas**

**Maio, 2017**

# **APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO: MARCADORES DE GRAVIDADE E DE RESPOSTA À TERAPÊUTICA**

**Amélia Maria dos Santos Feliciano**

**Orientador: Cristina Bárbara, Professora Associada da Faculdade de Medicina de Lisboa**

Co-orientadores: Palma dos Reis, Professor Associado da Faculdade de Ciências Médicas;

Paula Pinto, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina de Lisboa;

Deborah Penque, Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na Especialidade de Investigação Clínica**

**Maio, 2017**

**Trabalho para Dissertação de Doutoramento em Medicina  
de Amélia Maria dos Santos Feliciano, apresentado  
à Nova Medical School / Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Nova de Lisboa**

De acordo com o nº2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, a autora declara que participou na conceção, execução e interpretação dos resultados deste trabalho científico e que todas as afirmações efetuadas no presente documento são da sua exclusiva responsabilidade, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Ciências Médicas pelos conteúdos apresentados.



Esta Tese foi redigida ao abrigo do acordo ortográfico,  
excetuando o anexo que está conforme o documento original.

## ÍNDICE

<b>Resumo.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>15</b>
<b>Lista de Figuras e de Tabelas.....</b>	<b>18</b>
<b>Preâmbulo.....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo 1</b>	
Introdução.....	22
Artigo de Revisão.....	43
<b>Capítulo 2</b>	
Objetivos.....	69
<b>Capítulo 3</b>	
Metodologia.....	72
3.1 Organização e Gestão.....	72
3.2 Tipo de estudo e população .....	73
3.3 Material e Métodos.....	76
3.4 Análise Estatística.....	84
<b>Capítulo 4</b>	
Resultados.....	86
<b>Estudo 1</b> - Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males with obstructive sleep apnea.....	89
<b>Estudo 2</b> – Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure.....	106
<b>Estudo 3</b> – Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameter.....	115
<b>Capítulo 5</b>	
5.1 Discussão.....	138
5.2 Conclusões.....	152
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>154</b>
<b>Bolsas.....</b>	<b>155</b>
<b>Anexo</b>	
Consentimento Informado.....	156
Documento Informativo dirigido ao Participante.....	157
<b>Bibliografia.....</b>	<b>159</b>

---

## RESUMO

A síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um distúrbio respiratório do sono. Consiste num conjunto de sintomas e sinais que resulta dos episódios recorrentes de obstrução intermitente da via aérea superior, que ocorrem apesar da existência de esforço respiratório. Estima-se que esta síndrome seja muito frequente. No entanto, desconhece-se a sua verdadeira prevalência, uma vez que se encontra sub-diagnosticada. A SAOS é considerada uma doença sistémica à qual se associam várias consequências, nomeadamente doenças cardiovasculares e metabólicas, o que a torna num problema de saúde pública. As complicações cardiovasculares, pelo seu impacto individual, social e económico, são talvez as consequências mais bem estudadas da SAOS. Também os distúrbios metabólicos têm merecido especial atenção, não só pela relação bidirecional com a SAOS, mas também pela sua contribuição a nível do risco cardiovascular. A polissonografia (PSG) é o exame de eleição para o diagnóstico da SAOS. No entanto, o facto de ser um exame moroso e exigente em termos de recursos, acaba por contribuir para o sub-diagnóstico desta patologia. O tratamento de primeira linha da SAOS consiste no uso noturno de dispositivos de pressão positiva da via aérea (PAP). No entanto, os efeitos a nível clínico e fisiopatológico desta terapêutica são ainda tema de debate. Globalmente, estas razões têm sido responsáveis pela procura de métodos alternativos e que possam ser usados no diagnóstico, na avaliação do prognóstico e/ou da resposta à terapêutica.

Estudos recentes têm incidido, principalmente, na procura direccionada de biomarcadores metabólicos, de inflamação e de *stress* oxidativo da SAOS e das patologias que lhes estão associadas. Apesar de vários candidatos a biomarcadores terem emergido nos últimos anos, nenhum foi considerado como biomarcador adequado para o diagnóstico. Este facto deve-se provavelmente à diversidade clínica e à complexidade fisiopatológica da SAOS. Assim, justifica-se trabalho adicional na pesquisa de biomarcadores, com enfoque no prognóstico e na resposta à terapêutica. Para além dos parâmetros metabólicos, especial atenção tem sido dada à homocisteína, bem como aos parâmetros do hemograma, como o *red blood cell distribution width* (RDW) e alguns índices plaquetários, como biomarcadores associados à morbilidade/mortalidade cardiovascular. No entanto, persistem dúvidas acerca da relação entre estes diversos parâmetros e a gravidade da SAOS, bem como quanto ao seu comportamento sob terapêutica com PAP. Adicionalmente, na procura de biomarcadores da SAOS, tem sido dado especial destaque ao *stress* oxidativo, por ser considerado o paradigma unificador da morbilidade cardiovascular e dos distúrbios metabólicos que lhe estão associados. Presentemente, sabe-se que os glóbulos vermelhos (GV) são os principais efetores do sistema anti-oxidante vascular. No entanto, permanece por estudar, nos doentes com SAOS, se

proteínas eritrocitárias, pertencentes às vias de *stress* oxidativo, poderão servir de biomarcadores de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP.

Assim, em alternativa à pesquisa convencional ou direcionada de biomarcadores, tem ganho expressão a pesquisa exploratória de proteínas. Neste campo, a proteómica tem sido uma ferramenta fundamental, pois permite a pesquisa simultânea de inúmeras proteínas, passíveis de serem potenciais biomarcadores de várias doenças, incluindo da SAOS. Apesar disso, até ao momento, existem poucos estudos de proteómica na SAOS e nenhum usando os GV como meio biológico.

O **primeiro artigo**, publicado no âmbito desta tese, consistiu numa revisão acerca do estado da arte sobre a proteómica aplicada na SAOS. Neste artigo foi feita uma revisão dos estudos proteómicos realizados na população pediátrica e adulta, levados a cabo com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores aplicados ao diagnóstico/tratamento desta entidade clínica.

A presente dissertação teve como objetivo geral investigar, numa amostra de doentes com SAOS, a existência de biomarcadores de gravidade e de resposta à terapêutica, através da pesquisa direcionada tradicional (convencional) e da pesquisa exploratória (proteómica). Definiram-se como objetivos específicos avaliar, nos doentes com SAOS, o comportamento de marcadores de inflamação, metabólicos e de *stress* oxidativo. Em concreto, pela via convencional pretendeu-se avaliar o comportamento da homocisteína, dos parâmetros glicídicos, lipídicos e do hemograma, e pela via exploratória (proteómica) as proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas e pertencentes às vias de *stress* oxidativo. Para a operacionalização destes objetivos foram desenvolvidos três estudos, para os quais se procedeu ao recrutamento sequencial de indivíduos a partir da Consulta de Patologia do Sono do Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE. Foram recolhidos dados demográficos, polissonográficos e analíticos, com base nos quais se desenvolveu uma base de dados e criou-se um biobanco de amostras biológicas. No período de 24 meses foi selecionada uma população de 103 doentes do género masculino, com idades compreendidas entre os 25 e os 60 anos, que realizaram PSG e avaliação analítica (sangue e urina). Excluíram-se doentes do género femininos, assim como portadores de outras doenças do sono, diabetes mellitus tipo I, dislipidemia familiar e doença aguda/grave. A partir dos 103 doentes estabeleceu-se um grupo de estudo com 73 doentes com SAOS e um de controlo com 30 roncadores sem SAOS. Os grupos eram comparáveis em termos de características demográficas e história clínica, exceto a maior prevalência de dislipidemia e de obesidade nos doentes com SAOS. A partir desta população foram selecionadas amostras para investigação de biomarcadores pela via direcionada, ou convencional, e pela via exploratória, ou proteómica.

O **primeiro estudo** avaliou a homocisteína e os perfis glicémico e lipídico nos roncadores (n=30) e nos doentes com SAOS (n=73), de diferentes gravidades (46=63% eram ligeiros/moderados

e os restantes eram graves). O referido estudo demonstrou que os doentes com SAOS grave podem exibir alterações do perfil glicémico mesmo na ausência de diabetes conhecida, com repercussão na glicémia, hemoglobina glicosilada (HbA1c), insulina e resistência à insulina. Estes parâmetros estiveram relacionados com a gravidade da doença. Adicionalmente, a homocisteína, os perfis glicémico e lipídico alteraram-se significativamente após 6 meses de tratamento com PAP nos doentes com SAOS grave, sugerindo o efeito protetor cardiovascular e metabólico da PAP. Concluiu-se, assim, que a homocisteína, os perfis glicémico e lipídico são parâmetros acessíveis e económicos, que podem complementar a abordagem diagnóstica e de seguimento dos doentes com SAOS.

O **segundo estudo** avaliou os parâmetros do hemograma nos doentes com SAOS (n=73) de diferentes gravidades (em que 36 =49,3% eram ligeiros, 10 =13,7% eram moderados e 27 =37% eram graves). O estudo demonstrou uma associação positiva entre os valores do RDW e a gravidade da SAOS. Adicionalmente, foi avaliado um subgrupo de 48 doentes após 6 meses de tratamento com PAP. Verificou-se que a contagem de GV, a hemoglobina, o hematócrito e a contagem de plaquetas diminuíram de forma significativa após este período de terapêutica. Considerando a gravidade da SAOS, estes parâmetros também diminuíram de forma significativa nos doentes ligeiros mas apenas a hemoglobina, o hematócrito e a contagem das plaquetas diminuíram significativamente nos doentes graves. Estes resultados também suportam o efeito protetor cardiovascular da PAP. Concluiu-se que o RDW pode tornar-se um biomarcador sanguíneo acessível e financeiramente atrativo, potencialmente útil no estabelecimento de prioridade nos doentes com suspeita de SAOS a aguardar PSG, sendo os parâmetros eritrocitários e plaquetários vantajosos no seguimento dos doentes com SAOS sob tratamento com PAP.

Para o **terceiro estudo**, a partir da amostra inicial e após a exclusão de diabetes tipo 2 e doença cerebrovascular, foi selecionada uma outra amostra para análise proteómica exploratória e que decorreu em duas fases, designadas de fase de descoberta e fase de validação. Na fase de descoberta, foi selecionada uma amostra de 12 roncadores e de 12 doentes com SAOS (moderados/graves). A análise proteómica foi realizada nos GV através da técnica de 2-DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*) associada a espectrometria de massa (*mass spectrometry* - MS) antes (noite) e após (manhã) a PSG, a fim de serem analisadas as variações do proteoma entre estes dois tempos. As proteínas desreguladas pertenceram ao grupo das enzimas catalíticas, de resposta ao *stress* e reguladores redox, como é o caso da peroxirredoxina 2 (PRDX2). Na fase de validação, foi selecionada uma outra amostra, agora de 10 roncadores e de 10 doentes com SAOS (ligeiros, moderados e graves). Verificou-se que nos GV dos doentes com SAOS, as formas monoméricas/diméricas da PRDX2 estavam mais sobreoxidadas no período da manhã

comparativamente com o período da noite. Verificou-se, ainda, que os níveis matinais de PRDX2 sobreoxidada estavam correlacionados com o índice de despertar e parâmetros metabólicos (HbA1c, insulina, resistência à insulina), enquanto os níveis noturnos dos dímeros dissulfido, associados à atividade peroxidase da PRDX2, estavam relacionados com parâmetros polissonográficos (índice de distúrbio respiratório, % tempo com saturação <90% e índice de dessaturação de oxigênio). Após 6 meses de tratamento com PAP, ocorreu uma diminuição desta sobreoxidação e foram geradas formas sobreoxidadas multiméricas da PRDX 2, que se sabe apresentarem atividade de *chaperone*/transdução da sinalização. Após tratamento, os multímeros matinais da PRDX 2 estavam correlacionados negativamente com a glucose em jejum e os níveis de dopamina urinária. Globalmente, estes resultados apontam para a existência de *stress* oxidativo grave e alteração da homeostasia anti-oxidante nos GV dos doentes com SAOS ocorrendo sobretudo pela manhã, mas com consequências até à noite. O tratamento com PAP apresentou um efeito benéfico na modulação do estado redox/oligomérico da PRDX2, cujo mecanismo e funções associadas de *chaperone*/transdução da sinalização justificam mais investigação. A PRDX2 eritrocitária poderá ser um biomarcador promissor da gravidade da SAOS e da monitorização do seu tratamento.

Em conclusão, os resultados desta tese reforçam o uso da homocisteína, dos perfis glicémico e lipídico e do hemograma como parâmetros complementares da abordagem diagnóstica e de seguimento dos doentes com SAOS. Os resultados apontam, também, para o uso do RDW como biomarcador sanguíneo de estabelecimento de prioridade nos doentes com suspeita de SAOS a aguardar PSG, e ainda que a PRDX2 eritrocitária poderá ser um biomarcador promissor da gravidade da SAOS e da monitorização do tratamento.

**Palavras-chave:** apneia obstrutiva do sono, SAOS, doença metabólica, doença cardiovascular, biomarcadores, glucose, insulina, resistência à insulina, HOMA-IR, HbA1c, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos, lipídeos, diabetes, homocisteína, hemograma, RDW, parâmetros, eritrocitários, parâmetros plaquetários, *stress* oxidativo, proteómica, electroforese bidimensional, espectrometria de massa, peroxirredoxina.

---

**ABSTRACT**

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a sleep-related disorder characterized by symptoms and signs due to intermittent episodes of upper airway obstruction, despite ongoing inspiratory efforts. It is estimated that this disorder is common but the real prevalence is unknown since this syndrome is under-diagnosed. OSAS is considered as a systemic disease associated with several consequences, notably cardiovascular and metabolic, making OSAS a public health concern. Cardiovascular consequences bring individual, social, and economic impact, and for that are, perhaps, the most studied OSAS's consequences. In addition, systematic attention has been given to metabolic disturbances. These disturbances are related to OSAS in a bidirectional way and they also contribute to cardiovascular OSAS associated diseases. Polysomnography (PSG) is a very complete exam, being the gold standard for OSAS diagnosis. However, this exam needs several resources and there is a waiting list to perform it, contributing to OSAS's under diagnosis. The OSAS first line treatment is the use of positive airway pressure (PAP) devices during sleep. However, their clinical and pathophysiological effects are not consensual. Altogether, these reasons have justified the scientific concern to find alternative methods to help diagnosis, prognosis or treatment evaluation.

Recent studies have been focusing on metabolic, inflammatory and oxidative stress specific markers, for OSAS disease and its associated consequences. Although there have been several candidates, none was considered as a diagnostic biomarker. This fact is probably due to clinical OSAS diversity and pathophysiological complexity. As a result, additional work is required in biomarker research focusing on prognosis and treatment response. Besides metabolic parameters, consideration has been given to homocysteine and hemogram data, such as the Red blood cell distribution width (RDW) and some platelet indices, as cardiovascular morbidity/mortality biomarkers. However, limited data is available on the association between these parameters and OSAS's severity and their behavior on PAP therapy. In addition, several studies have explored pathophysiological mechanisms of OSAS and its associated diseases. Special attention has been paid to oxidative stress, due the fact that it has been considered to be the unified paradigm of OSAS cardiovascular morbidity and its metabolic underlying disturbances. Nowadays, red blood cells (RBC) are considered to be the main effectors of anti-oxidant vascular system. Nevertheless, further research on OSAS's RBC is needed, to evaluate the expression of proteins belonging to oxidative stress processes, which could become markers of prognosis and response to PAP therapy.

Thus, in alternative to conventional biomarker investigation, exploratory investigation has gained more expression. The advanced high-throughput proteomics-based technologies have become

a fundamental approach to simultaneously explore several disease mediators for many diseases, including OSAS. Conversely, there are few studies concerning the use of proteomics in OSAS and neither of them used RBC as biological sample.

In this thesis, the **first paper** included a review about the state-of-the-art proteomics in OSAS. In this paper the authors reviewed proteomic studies in children and adults with OSAS, undertaken to find potential diagnostic and treatment markers. The current research aims to evaluate in OSAS patients' biomarkers of prognosis and response to treatment, in two different ways, by means of conventional and exploratory (proteomic) research. In terms of specific objectives, this research intended to evaluate metabolic, inflammatory, and oxidative stress markers behaviour in OSAS patients. In specific terms, homocysteine, glicidic, lipidic, and hemogram parameters were evaluated by using a conventional approach, and RBC proteins differentially expressed and belonging to oxidative stress, by using an exploratory (proteomic) approach. Accordingly, three studies were performed. The study patients, who were male individuals from a Sleep Clinic of Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE, were consecutively recruited to participate. Demographic, polysomnographic, and analytical parameters were analysed. A database was developed to store this information and, associated with it, a biobank for biological samples was created. During 24 months, a total of 103 male patients, aged 25-60 years old were selected to perform PSG and blood and urinary analysis. The exclusion criteria were female patients, other sleep disorders, type I diabetes mellitus, familiar dyslipidemia, and acute/severe disease. One-hundred and three patients were included, where 73 (71%) were OSAS patients and the remainder were snorers. OSAS patients were similar to snorers concerning demographics and medical information except for the existence of known dyslipidemia and higher body mass index (BMI). From this population, different samples were selected for conventional and proteomic evaluation.

The **first study** analysed homocysteine, glycemic, and lipidic profiles in snorers (n=30) and OSAS patients (n=73) of different severities (46 (63%)) were mild/moderate and the remainder were severe). The present study demonstrated that severe OSAS patients may exhibit changes in glycemic profile, even in absence of known diabetes, with compromise of glycemia, HbA1c, insulin, and insulin resistance, and these were correlated with OSAS severity. Moreover, homocysteine, glycemic, and lipidic profiles changed significantly after 6 months of PAP therapy in severe OSAS patients, supporting cardiovascular and metabolic protective effect of PAP. To conclude, homocysteine, glycemic, and lipidic profiles are accessible and inexpensive blood parameters, which should complement diagnostic and follow-up approach of OSAS patients.

The **second study** analysed hemogram parameters in OSAS patients (n=73) of different severities (36 were mild (49.3%), 10 moderate (13.7%), and 27 severe (37%)). This study reported a



positive association between RDW values and OSAS severity. Additionally, a subgroup of 48 patients underwent six months of PAP treatment. After this period, red blood cell count, haemoglobin, haematocrit, and platelet count showed a significant decrease. Concerning the severity of OSAS, these parameters have also significantly decreased in mild patients but only haemoglobin, haematocrit, and platelet count decreased in severe patients. These results support a cardiovascular protective effect of PAP. RDW may become an accessible/inexpensive blood biomarker, making it useful in prioritizing OSAS patients' awaiting for polysomnography, and red cell and platelet parameters could be useful in PAP follow-up.

In the **third study**, and after exclusion of type 2 diabetes and cerebrovascular disease, a sample of patients was selected for proteomic analysis. This analysis was performed in two stages: the discovery and the validation stages. In the discovery stage, a sample of 12 snorers and 12 OSAS patients (moderate/severe) were selected. The proteomic evaluation in RBC was performed through 2-DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*) associated with mass spectrometry (MS) at pre- (evening) and post- (morning) PSG so that proteome variations between these time points could be also assessed. Dysregulated proteins mainly fell in the group of catalytic enzymes, stress response, and redox regulators, such as peroxiredoxin 2 (PRDX2). In the validation stage, a sample of 10 snorers and 10 OSAs patients (mild, moderate and severe) were selected and validation assays confirmed that in the morning the monomeric/dimeric forms of PRDX2 were more overoxidized in OSAS RBC when compared to evening samples. Morning levels of overoxidized PRDX2 correlated with arousal index and metabolic parameters (HbA1c, insulin, insulin resistance), whereas the evening level of disulfide-linked dimer associated with peroxidase activity of PRDX2 correlated with PSG parameters (respiratory disturbance index, % of time with saturation under 90% and oxygen desaturation index). Six months of PAP treatment decreased this overoxidation and generated multimeric overoxidized forms associated with *chaperone*/transduction signaling activity of PRDX2. After treatment, morning multimer of PRDX2 was negatively correlated with fasting glucose and urinary dopamine levels. Overall, these data point toward severe oxidative stress and altered antioxidant homeostasis in OSAS RBC occurring mainly at morning time but with consequences till the evening. The beneficial effect of PAP involves modulation of the redox/oligomeric state of PRDX2, whose mechanism and associated *chaperone*/transduction signaling functions deserves further investigation. RBC PRDX2 is a promising biomarker for OSAS severity and treatment monitoring.

In conclusion, the results of this thesis reinforce the use of homocysteine, glycemic and lipidic profiles, and hemogram as complementary parameters in diagnosis and follow-up approach of OSAS

patients. The results point to the use of RDW as a useful biomarker in prioritizing OSAS patients awaiting for polysomnography and PRDX2 as a promising biomarker for OSAS severity and treatment monitoring.

**Key Words:** obstructive sleep apnea, OSA(S), metabolic disease, cardiovascular disease, biomarkers, glucose, insulin, insulin resistance, HOMA-IR, HbA1c, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, lipid, diabetes, homocysteine, hemogram, RDW, red cell parameters, platelet parameters, oxidative stress, proteomic, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, peroxiredoxin 2.

---

**ABREVIATURAS**

**AASM** – American Academy of Sleep Medicine (\*)  
**ACP** – American College of Physicians (\*)  
**ATP** – Adenosina Trifosfato  
**ATS** – American Thoracic Society (\*)  
**AVC** – Acidente Vascular Cerebral  
**CHLN** – Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE  
**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono  
**Cp** - cisteína peroxidática  
**CPAP** – Contínuos Positive Airway Pressure (\*)  
**2D-DIGE** – Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Eletrophoresis (\*)  
**2DE** – Two-Dimensional Electrophoresis (\*)  
**DNA** - Desoxiribonucleic Acid (\*)  
**DP** – Desvio Padrão  
**ECTS** - European Credit Transfer and Accumulation System (\*)  
**ERS** – European Respiratory Society (\*)  
**FCM-UNL** – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa  
**GV** – Glóbulos Vermelhos  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogénio  
**Hb** - Hemoglobina  
**HbA1c** – Hemoglobina Glicada  
**HDL** - High-Density Lipoprotein (\*)  
**HMW** – High Molecular Weight (\*)  
**HOMA-IR** - Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (\*)  
**HTA** – Hipertensão Arterial  
**HTP** – Hipertensão Pulmonar  
**IAH** – Índice de Apneia-Hipopneia  
**IC** – Insuficiência Cardíaca  
**ICSD** – International Classification of Sleep Disorders (\*)  
**IL** - Interleucina  
**IMC** - Índice de Massa Corporal  
**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
**IQR** – Interquartil Range (\*)  
**LDL** – Low Density Lipoprotein (\*)  
**LMW** – Low Molecular Weight (\*)  
**MALDI** - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (\*)  
**mRNA** – Mensager Ribonucleic Acid (\*)  
**MS** – Mass Spectrometry (\*)

**NADPH** – NicotinamideAdenine Dinucleotide Phosphate (\*)

**NO** - óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - nitrito,

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion Superóxido

**ODI** – Oxygen Dessaturation Index (\*)

**ONOO<sup>-</sup>** - peroxinitrito

**PAP** –Pressão Aérea Positiva ou Positive Airway Pressure (\*)

**PCR** – Proteína C Reativa

**PDW** – Platelet Distribution With (\*)

**PRDX** – perorredoxina

**PSG** – Polissonografia

**RDI** – Respiratory Disturbance Index (\*)

**RDW** - Red Blood Cell Distribution (\*)

**REM** – Rapid Eye Movement (\*)

**RERA** – Respiratory Effort Related Arousal (\*)

**RNS** – Reactive Nitrogen Species (\*)

**ROS** - Reactive Oxygen Species (\*)

**SAOS** – Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono

**SM** – Síndrome Metabólica

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**SOD** - Superóxido Dismutase

**T0** – Tempo 0

**T6** – Tempo 6 meses

**T90** – Tempo com Saturação abaixo de 90%

**TNF** – Tumor Necrosis Factor (\*)

**TOF** - Time-of-Flight (\*)

**VAS** – Via Aérea Superior

**VCAM 1** - Vascular Cell Adhesion Molecule-1

**VGM** – Volume Globular Médio

(\*) Na presente tese, e relativamente aos termos desta forma assinalados, optou-se pela utilização da abreviatura da palavra anglo-saxónica, por ser aquela que é mais frequentemente usada no meio científico.

## LISTA DE FIGURAS E DE TABELAS

Figura 1: Principais consequências da SAOS.

Figura 2: Papel do *stress* oxidativo e da inflamação na SAOS e nas comorbilidades associadas.

Figura 3: Áreas de investigação no âmbito dos biomarcadores para a SAOS.

Figura 4: Vias de investigação de biomarcadores para a SAOS (convencional e exploratória).

Figura 5: Formação de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio no glóbulo vermelho.

Figura 6: Principais passos da abordagem diagnóstica dos doentes selecionados.

Tabela 1: Características principais da SAOS.

Tabela 2. Escala de Sonolência de *Epworth*, adaptada.

Tabela 3: Caracterização clínica e polissonográfica dos doentes selecionados.

Tabela 4: Caracterização analítica dos doentes selecionados.

Tabela 5: Resumo da função celular das proteínas identificadas por 2D-DIGE.

---

## PREÂMBULO

Durante o internato complementar de Pneumologia a autora teve o seu primeiro contacto com a síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS), nas vertentes de diagnóstico e terapêutica. Este primeiro contacto foi coincidente com o início da atividade da sala de ventilação eletiva e do laboratório do sono no Hospital de Pulido Valente, implementados pela Professora Doutora Cristina Bárbara. Posteriormente, e já como Assistente de Pneumologia exercendo a sua atividade no Centro Hospitalar Médio Tejo, sentiu a vontade e a necessidade de aprofundar os seus conhecimentos na área do sono, pelo que optou pela realização do Mestrado em Medicina do Sono, tendo a SAOS sido a base do trabalho de investigação da sua tese. Esta experiência, apesar de trabalhosa, foi muito gratificante, pois permitiu dar os primeiros passos de forma autónoma nesta área, mas com o privilégio de ter tido a orientação da Professora Doutora Teresa Paiva, referência obrigatória na Medicina do Sono.

Após a conclusão do seu Mestrado, e novamente a exercer a atividade no seu hospital de formação, foi incentivada pela Professora Doutora Cristina Bárbara a prosseguir os seus estudos nesta área, pelo que optou pela frequência da 1ª Edição do III Ciclo de Estudos de Doutoramento em Medicina. Esta oportunidade foi vista como um meio de permitir, mais uma vez, procurar responder a questões sobre a SAOS, particularmente tentando compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta síndrome e às suas consequências, com vista à possível descoberta de biomarcadores. A 1ª Edição do III Ciclo de Estudos de Doutoramento em Medicina (edição 2009 - 2013), na especialidade de Investigação Clínica, foi organizada pelo Gabinete de Estudos Pós-Graduados da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM – UNL), e contou com a coordenação dos Professores Doutores Maria João Marques Gomes, Ana Félix e Palma dos Reis.

A especialidade de Investigação Clínica encontrava-se estruturada em dois componentes, sendo o primeiro relacionado com a área científica “Medicina”, que decorreu no ano letivo de 2009/2010, e no qual a autora frequentou várias unidades curriculares, obtendo um total de 35 créditos ou ECTS (*European Credit Transfer and Accumulation System*). O segundo componente foi na área científica “Investigação Clínica”, que decorreu de 2010 a 2016, e incluiu a realização de um seminário de aprofundamento de conhecimento (10 ECTS) e um trabalho de investigação, que teve o intuito de elaborar uma dissertação original ou tese, que corresponderá no final a 195 ECTS.

Com vista à realização da dissertação, a autora elaborou um projeto de investigação intitulado “Apneia obstrutiva do sono e doenças metabólicas e cardiovasculares associadas: compreender mecanismos para um diagnóstico precoce e previsão do prognóstico”, que foi aprovado pelo Conselho Científico da Faculdade de Ciências Médicas (10/01/2012), Comissões de Ética da Faculdade de Ciências Médicas (20/11/2012), do Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. (06/01/2012) e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (04/07/2012) e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (13/08/2012). Este projeto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do programa da *Harvard Medical School – Portugal in Translational Research and Information* (HMSP-ICJ/0022/2011). Através deste programa frequentou em 2012 o *Program of Clinical Effectiveness* e em 2013 o *Summer Program in Clinical Effectiveness* na *Harvard School of Public Health*, em Boston, Estados Unidos da América. Estes cursos caracterizaram-se por uma atividade científica muito intensa, pois englobaram diversas valências formativas e trabalhos de avaliação, que foram uma mais-valia na sua formação.

Teve como mentor o Dr. Atul Malhotra, da *Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine*, da Universidade da Califórnia San Diego e do Programa de Investigação da *Division of Sleep Medicine Sleep Disorders* do Hospital *Brigham & Women’s* e da *Harvard Medical School*, Boston. Foi um enorme privilégio privar com o Dr. Atul Malhotra, figura reconhecida internacionalmente na Medicina do Sono, com múltiplos trabalhos de investigação publicados na área da SAOS. Com base no referido projeto, sucedeu-se um trabalho de pesquisa que decorreu no Laboratório do Sono (Responsável: Professora Doutora Paula Pinto), pertencente ao Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. (Diretora: Professora Doutora Cristina Bárbara) e no Laboratório de Proteómica (do Departamento de Genética Humana – Responsável: Professora Doutora Deborah Penque) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Este percurso contou com a supervisão e colaboração da Professora Doutora Cristina Bárbara, na qualidade de orientadora, e dos Professores Doutores Paula Pinto, Palma Reis e Deborah Penque, na qualidade de co-orientadores. O trabalho de investigação desenvolvido e os resultados obtidos servem de base à presente Tese de Doutoramento, agora intitulada “Apneia Obstrutiva do sono: marcadores de gravidade e de resposta à terapêutica”.

A elaboração duma dissertação incidindo na procura de biomarcadores para a SAOS foi um desafio pela complexidade e ousadia do tema. O facto desta doença se encontrar subdiagnosticada, aliado à dificuldade no diagnóstico atempado e à complexidade no tratamento, tem impulsionado a investigação de biomarcadores para a SAOS. Apesar dos múltiplos estudos nesta área, ainda não foi possível a descoberta de biomarcadores com papel no diagnóstico e aplicabilidade clínica. A possibilidade de usar ferramentas de investigação direcionada convencional e exploratória justificou

abraçar este tema. Na pesquisa exploratória considerou usar a proteômica, uma vez que permite a avaliação simultânea de várias proteínas diferencialmente expressas, e passíveis de serem candidatas a biomarcadores. Recentemente, têm surgido estudos sobre o uso da proteômica na descoberta de biomarcadores nas crianças com SAOS, mas com resultados ainda preliminares. Da mesma forma, estes estudos são também modestos no adulto com SAOS, apesar da SAOS ser um problema de saúde pública. Assim, considerou justificar-se a investigação direcionada convencional e exploratória de biomarcadores de gravidade e de resposta à terapêutica para a SAOS, mesmo com as fragilidades que comportam todo o trabalho de descoberta.

Quanto à organização da presente tese, salienta um capítulo introdutório onde aborda de forma geral o estado da arte da SAOS, da proteômica e, por fim, a importância da proteômica na avaliação desta patologia, apresentada na forma de artigo de revisão. O segundo e o terceiro capítulos fazem referência ao trabalho de investigação propriamente dito. No quarto capítulo são apresentados os estudos desenvolvidos e que serviram de base a esta tese. E no quinto capítulo é feita a discussão e são apresentadas as conclusões. De seguida são feitos os agradecimentos e são apresentadas as bolsas. Esta tese termina com o anexo onde consta o consentimento informado e com a referência à bibliografia consultada.



# *CAPÍTULO 1*

## INTRODUÇÃO

### Definição da Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono

O sono, pelo seu padrão cíclico e pelas suas funções de manutenção da homeostasia do organismo, é parte integral da existência humana. Atualmente é preocupante a prevalência crescente dos distúrbios do sono, que atingem 23 a 56% da população geral [1], estimando-se que menos de 20% dos indivíduos com estes distúrbios estejam corretamente diagnosticados e tratados [2]. Destes salientam-se os distúrbios respiratórios relacionados com o sono, onde se inclui a SAOS, de acordo com a última Classificação dos Distúrbios do Sono (*International Classification of Sleep Disorders, 3rd edition - ICSD-3*), publicada em 2014 pela Academia Americana de Medicina do Sono [3]. Esta é a patologia respiratória do sono mais frequente nos adultos e, devido ao seu impacto na saúde física, psíquica e social, tem merecido nos últimos anos destaque na literatura científica mundial e nas últimas quatro décadas tem sido considerada como um importante problema de saúde pública. Assim, o diagnóstico dos distúrbios do sono em geral, e em particular da SAOS, reveste-se de grande importância, quer do ponto de vista clínico, quer do ponto de vista social e económico.

Muito se evoluiu desde as primeiras descrições da apneia obstrutiva do sono, que remontam ao período da Grécia Antiga [4], até à definição atual, que considera a SAOS como um conjunto de sintomas e sinais que resulta dos episódios recorrentes de obstrução parcial ou completa da via aérea superior (VAS) durante o sono. Esses episódios podem ser do tipo obstrutivo ou misto, totalizando mais do que 75% dos eventos. Eventos de natureza central e alterações mais subtis da respiração, como o despertar relacionado com o esforço respiratório (*Respiratory Effort Related Arousal - RERA*), também ocorrem nestes doentes. Para além dos episódios repetidos de obstrução da VAS, acrescenta-se que frequentemente os doentes com SAOS apresentam ronco, alteração das trocas gasosas e da macroestrutura do sono.

### Dados epidemiológicos

Segundo estudos epidemiológicos, a SAOS é o segundo distúrbio do sono com maior prevalência, sendo apenas ultrapassado pela insónia (a qual afeta 33-50% da população adulta [5]). É o distúrbio respiratório relacionado com o sono mais comum, sendo predominante nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Num dos estudos mais referenciado e rigoroso na

literatura, Young e colaboradores sugerem que em 24% dos homens e 9% das mulheres ocorrem pelo menos 5 eventos respiratórios por hora de sono, numa população de funcionários públicos do Wisconsin com menos de 65 anos [6]. No mesmo estudo, a síndrome clínica, isto é, a co-existência de sonolência diurna excessiva, tem uma prevalência de 2% no género feminino e 4% no género masculino. Após alguns anos, os mesmos autores consideraram que a prevalência podia ser maior, estimando que 93% das mulheres e 82% dos homens de meia-idade com provável SAOS, moderada a grave, não foram diagnosticados [7].

Apesar do progresso relativamente ao reconhecimento público da SAOS, esta mantém-se uma entidade clínica subdiagnosticada na população geral [8]. Uma estimativa global em diferentes países aponta para uma prevalência de 3 a 7% nos homens adultos e 2 a 5 % nas mulheres na população geral [9]. Estudos mais recentes reportam uma prevalência da SAOS (índice de apneia-hipopneia - IAH 5) de 22% nos homens (9-37%) e 17 % nas mulheres (4-50%), com base em 11 estudos publicados entre 1993 e 2013 [10]. Considerando a gravidade, a prevalência da SAOS moderada e grave é de 23,4% nas mulheres e 49,7% nos homens [11]. Quando, para além do IAH 5 eventos/hora, se considerar a presença de sonolência diurna, a prevalência é de 6% nos homens (3-18%) e 4% nas mulheres (1-17%) [10]. Uma revisão sistemática da literatura muito recente [12], englobando as várias regiões do mundo, reportou uma prevalência na população geral de 9 a 38%; em que no género masculino esta variou de 13 a 33%, enquanto no género feminino variou de 6 a 19%. O mesmo estudo revelou uma maior prevalência de SAOS nas idades mais avançadas (mais de 65 anos), podendo atingir os 84% e confirmou um efeito positivo da idade avançada, do género masculino e de maior índice de massa corporal (IMC) na prevalência da SAOS.

Relativamente a Portugal, refere-se um trabalho que consistiu na realização de uma entrevista telefónica a 975 adultos acerca da existência de sintomas sugestivos da SAOS, que apontou para uma prevalência entre 2,2 e 7,9% [13]. Até ao momento não foi desenvolvido, em Portugal, nenhum estudo de prevalência da SAOS, mas dados recentes da população sob a observação da Rede Médicos-Sentinela dos Cuidados de Saúde Primários [14] estimaram uma prevalência de SAOS de 0,89%, na população com idade superior a 25 anos, sendo superior no género masculino (1,47%) e no grupo etário entre os 65 e os 74 anos (2,35%). A maioria dos casos diagnosticados correspondeu a SAOS moderada a grave (82,4%) e a proporção de doentes em tratamento com ventiloterapia foi de 89,6%. Estes dados podem apontar para um considerável subdiagnóstico de SAOS em Portugal. O facto de em Portugal não existirem estudos robustos acerca da prevalência da doença, torna frágil o planeamento de estratégias diagnósticas e terapêuticas ajustadas à realidade nacional.

Na vizinha Espanha estima-se que a prevalência da SAOS, nos indivíduos entre os 30 e os 70 anos, seja de 28% nas mulheres e 26.2% nos homens [15]. Adicionalmente, um estudo recente, que

incidiu sobre a prevalência global da SAOS em Espanha durante o período de 5 anos, demonstra uma tendência para o aumento da doença neste país [16].

Apesar do número elevado de estudos epidemiológicos sobre a SAOS, existem algumas limitações metodológicas, tais como diferenças nas amostras selecionadas, disparidades nas técnicas usadas no diagnóstico e variabilidades nas definições, o que pode condicionar o conhecimento da verdadeira prevalência da doença. Mesmo assim, as prevalências apontadas são consideráveis, tornando a SAOS num problema de saúde pública. Este facto tem um impacto importante na sociedade, decorrente dos custos relativos ao diagnóstico e tratamento, diminuição da qualidade de vida e consequências para a saúde.

A elevada prevalência da SAOS é um verdadeiro desafio para os profissionais de saúde no que concerne à disponibilização de recursos humanos e físicos que possibilitem o diagnóstico e o tratamento. No entanto, considera-se que estes dados epidemiológicos subestimam a verdadeira dimensão da doença, considerando o aumento dos fatores de risco, como a obesidade e o envelhecimento, e a melhoria da tecnologia diagnóstica que tem ocorrido nos últimos anos. E portanto, a maioria dos doentes com SAOS permanece por diagnosticar [17] e por tratar [18].

### **Fatores predisponentes da SAOS**

Em termos globais, a SAOS é uma entidade clínica heterogénea [19] que decorre de alterações anatómicas da VAS (estreita/facilmente colapsável) a que se associam vários fatores não anatómicos, como o controlo dos músculos faríngeos, o limiar do despertar, a estabilidade do controlo ventilatório, o volume pulmonar, a tensão da superfície da VAS e a posição durante o sono (revisão em [20]). A contribuição desses diferentes fatores varia consoante a gravidade da doença (revisão em [20]) e pensa-se que estas diferenças sejam responsáveis pela eficácia variável dos diferentes tipos de tratamento.

Na SAOS são vários os fatores patogénicos (genéticos, do desenvolvimento e ambientais) que contribuem para o colapso da VAS. Esse colapso geralmente ocorre ao nível da orofaringe e/ou hipofaringe, que se caracteriza por ser uma região anatómica desprovida de suporte rígido. Estes fatores podem ser agrupados em modificáveis (obesidade, substâncias, tabagismo, posição durante o sono) ou não (género masculino, idade, etnia, anatomia crânio-facial e predisposição genética). Dos vários fatores patogénicos destaca-se a obesidade, em particular o IMC e a gordura visceral [21], como sendo o factor mais comum e reversível da SAOS [22]. De acordo com as observações clínicas, o IMC e o perímetro do pescoço são os melhores predictores da SAOS [23, 24]. Verifica-se, inclusivamente, que a prevalência da SAOS está associada à epidemia global da obesidade,

aumentando com o peso [25] e podendo atingir entre os 60 e 70% nos indivíduos obesos [26]. Para além disso, 35% da variação na gravidade da SAOS é devida a fatores genéticos [9].

### Características clínicas da SAOS

As principais características da SAOS incluem as perturbações do padrão respiratório durante o sono, os sinais de sono interrompido e os sintomas diurnos decorrentes da fragmentação do sono, justificando que o doente com SAOS apresente um conjunto variável de sintomas e sinais diurnos e noturnos (tabela 1).

Perturbações do padrão respiratório	Sintomas diurnos	Sintomas noturnos
Apneias	Sonolência diurna excessiva	Ressonar
	Sensação de sono não reparador	Apneias visualizadas
	Dificuldade em manter a atenção	Diaforese
	Compromisso da memória e da	Notúria excessiva
Hipopneias	concentração	Sensação de asfixia
	Dificuldade nas tarefas que exigem	Outros: dispneia, despertares, boca
RERA	destreza	seca, refluxo gastro-esofágico,
	Disfunção sexual	hiperonirismo
	Cefaleias matinais	
	Irritabilidade	
	Distúrbios depressivos	

**Tabela 1:** Características principais da SAOS. Legenda: RERA (*respiratory effort related arousal* ou despertar relacionado com o esforços respiratório).

Face à heterogeneidade e complexidade da SAOS, existem diferentes fenótipos clínicos para esta entidade. Uma revisão recente reforçou a importância de se conhecerem esses fenótipos, de forma a orientar a abordagem diagnóstica e terapêutica [27]. A abordagem com base nos fenótipos é um passo fundamental para a medicina personalizada na SAOS. São exemplos de fenótipos a SAOS associada à sonolência diurna, a SAOS no idoso, a SAOS associada à insónia, a SAOS não associada a comorbilidades, entre outros [27].

Considerando a variedade de sintomas e sinais diurnos e noturnos da SAOS, outras doenças podem mimetizar esta entidade clínica, como a roncopatia, a doença pulmonar, o laringospasmo relacionado com o sono, o distúrbio na deglutição, os ataques de pânico, a asma durante a noite, o refluxo gastro-esofágico, as convulsões noturnas e a insónia.

## Diagnóstico

Os doentes com SAOS frequentemente desconhecem que têm esta condição, que geralmente é primeiro reconhecida por um familiar que testemunha os sinais noturnos e os sintomas diurnos. Inclusivamente, é comum o doente relatar um menor grau de compromisso funcional do que aquele relatado pelo companheiro(a), o que pode decorrer de alguma negação, do compromisso cognitivo já existente e/ou pela habituação aos sintomas. A avaliação geral do doente, isto é, história clínica com exame físico completo, é o primeiro passo no diagnóstico da SAOS. No entanto, a impressão clínica isolada é insuficiente para o diagnóstico desta patologia [28], sendo sempre necessário recorrer a um estudo objetivo. De facto, estima-se que a maioria dos indivíduos com SAOS não está diagnosticada nem tratada, sugerindo que os recursos disponíveis são insuficientes para satisfazer as necessidades crescentes [29]. Presentemente, não é prático nem economicamente viável rastrear com estudos do sono toda a população, sendo reconhecida a importância de identificar a SAOS nos doentes com história clínica sugestiva e nos grupos de elevado risco (com doença cardiovascular ou metabólica) que beneficiarão de intervenção.

Os Membros da *American Thoracic Society* (ATS), *American Academy of Sleep Medicine* (AASM) e *American College of Chest Physicians* (ACCP) publicaram em 2003 os parâmetros práticos para o uso dos dispositivos na investigação da SAOS no adulto [30] e essas diretrizes foram revistas em 2007 [31]. Nessas publicações foram considerados os dispositivos do Tipo 1 (polissonografia - PSG), do Tipo 2 (PSG portátil), do Tipo 3 (estudos poligráficos de 4 a 7 canais) e do Tipo 4 (estudos poligráficos de 1 ou 2 canais) [30, 31]. As indicações para a realização dos estudos do sono foram estabelecidas pela AASM [31, 32, 33], e também recentemente o ACCP desenvolveu um conjunto de directrizes acerca das recomendações quanto ao diagnóstico da SAOS nos adultos [34]. Em resumo, a PSG continua a ser o método de eleição no diagnóstico da SAOS. No entanto, este exame é dispendioso, em termos de tempo e de recursos humanos, laborioso e não se encontra amplamente disponível [18, 35]. Acresce que os laboratórios têm uma capacidade limitada para a sua realização e no caso de Portugal estima-se que a média do tempo de espera para a realização de um estudo do sono em instituições públicas seja de 6,8 meses, e em instituições privadas seja de 1 mês [36].

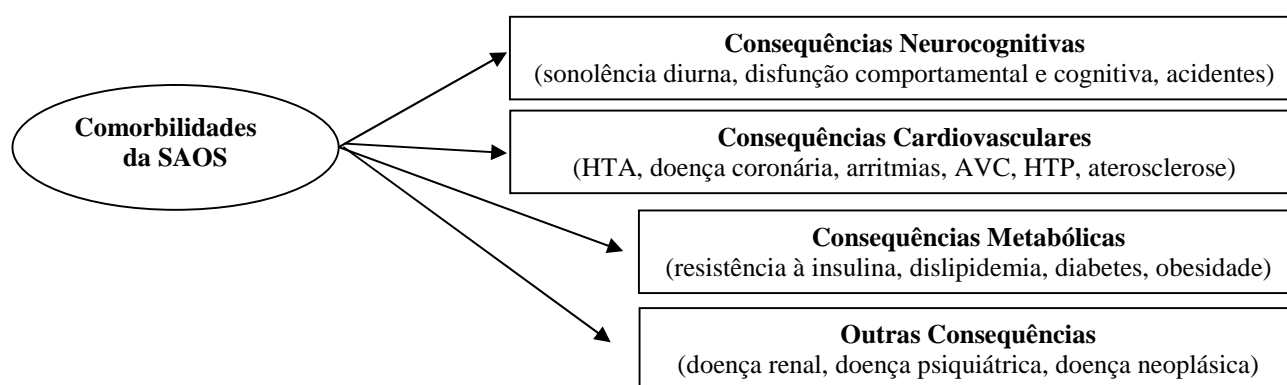
Devido a este facto, o desenvolvimento e a validação de novas modalidades diagnósticas, que permitem o estudo do doente em ambulatório, foram identificados como uma prioridade na investigação pelas ATS, AASM, ACCP e *European Respiratory Society* (ERS) [37]. Assim, tem havido um interesse crescente na realização dos estudos do sono com equipamento portátil e no

domicílio, em alternativa à PSG convencional [38], bem como têm sido exploradas outras técnicas, a maioria centrada nas variáveis cardiovasculares. São exemplos a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca [39], a medição do tempo de trânsito do pulso [40] e a tonometria arterial periférica [41, 42], entre outros [43-48], mas ainda com carácter experimental.

Em conclusão, o diagnóstico da SAOS alicerça-se na PSG. No entanto, este exame exige recursos que o tornam pouco acessível e dispendioso, contribuindo para o subdiagnóstico. Por esse motivo, devem ser mantidos os esforços para encontrar um método de diagnóstico e/ou um método que permita estabelecer critérios de prioridade dos doentes em risco de SAOS.

### Consequências da SAOS

A história natural da SAOS ocorre habitualmente ao longo de vários anos, pelo que é considerada desde longa data uma perturbação crónica [49], com impacto social e económico, resultado da elevada comorbilidade e maior utilização dos serviços de saúde [50-53]. Quanto às consequências a longo prazo da SAOS, estas podem ser neurocognitivas, cardiovasculares e metabólicas (figura 1).



**Figura 1:** Principais consequências da SAOS. Legenda: HTA – hipertensão arterial sistémica; AVC: acidente vascular cerebral; HTP: hipertensão pulmonar.

Quanto às **consequências neurocognitivas**, destacam-se a hipersonolência diurna, a diminuição da função cognitiva nas áreas da atenção, vigilância, aprendizagem, memória e da função executiva [54-56], dificuldades no relacionamento interpessoal com impacto no trabalho/escola [57] e maior risco de acidentes de trabalho e de viação [58-60]. Mais recentemente, a SAOS foi associada ao compromisso cognitivo ligeiro/demência [61].

Quanto às **consequências cardiovasculares**, estas são talvez as consequências mais bem descritas relativamente à SAOS, pois existe uma associação significativa entre estas duas entidades clínicas [62]. Muitos dados sugerem, mesmo, que a SAOS é um factor de risco independente cardiovascular [63,64]. Uma das consequências cardiovasculares associadas à SAOS que se destaca é a hipertensão arterial sistémica (HTA) [65,66], em particular o perfil noturno *nondipping* [67] e a HTA resistente à terapêutica [68, 69], devendo a monitorização da tensão arterial durante 24 horas ser um exame de rotina na abordagem dos doentes com SAOS, como recomendado pela *Task Force* entre a ERS e a *European Society of Hypertension* [63]. As outras consequências cardiovasculares são a insuficiência cardíaca (IC) [70], a doença coronária [70, 71], o enfarte agudo do miocárdio [72], as arritmias cardíacas [73, 74], a hipertensão pulmonar (HTP), o *cor pulmonale* crónico (estando a SAOS incluída no grupo 3 da Classificação da Hipertensão Pulmonar da Organização Mundial de Saúde [75]) e o acidente vascular cerebral (AVC) [76-78].

A SAOS não tratada pode aumentar a gravidade e a mortalidade da doença cardiovascular [79], e o risco cardiovascular da SAOS parece ser particularmente importante nos jovens [80]. Marin e colaboradores, num estudo observacional com mais de 1,600 doentes com SAOS, mostraram que os doentes com SAOS grave não tratada tinham um risco aumentado de eventos cardiovasculares fatais (morte por enfarte agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral) e não fatais (enfarte agudo do miocárdio não fatal, acidente vascular cerebral não fatal, cirurgia de *bypass* coronário, angiografia coronária percutânea) [81], resultados estes que foram confirmados por estudos posteriores [70, 82, 83]. Um estudo retrospectivo recente, com mais de 3,000,000 de doentes com SAOS, tratados e não tratados, reportou um maior risco de mortalidade (35% e 85% respetivamente) comparativamente com doentes sem SAOS [62]. Adicionalmente, a mortalidade ocorre mais frequentemente entre as 0 e as 6 horas, e aumenta com a gravidade da SAOS [84]. A SAOS, também, pode ser responsável pela incidência de episódios cardiovasculares durante a noite [85], ao contrário da população geral em que estes episódios ocorrem entre as 6-11 horas. Nos doentes com AVC, a presença de SAOS acarreta pior prognóstico na recuperação funcional [86] e maior mortalidade [87].

A SAOS também está associada a **consequências metabólicas**, destacando-se a **obesidade** [88], por ser a alteração metabólica mais frequente [89]. Por outro lado, a SAOS tem sido independentemente associada à **dislipidémia** [90]. Em concreto, os doentes com SAOS apresentam níveis elevados de ácidos gordos livres, de colesterol LDL (*low-density lipoprotein*) e de triglicéridos, e uma diminuição/disfunção do colesterol HDL (*high-density lipoprotein*) [91-94]. Atualmente considera-se que a SAOS está independentemente associada a alteração da **homeostase da glucose** e aumento da função das células pancreáticas  $\beta$  nos doentes obesos, sugerindo que a longo prazo a necessidade de maior função destas células possa contribuir para a sua exaustão, com



consequente compromisso da sua capacidade secretora e aparecimento de resistência à insulina [95]. De facto, a SAOS compromete o controlo glicémico [96] e contribui, também, para o desenvolvimento de menor sensibilidade à insulina, independentemente da obesidade e de outras medidas antropométricas, como a idade, o género, a raça e a percentagem de gordural corporal [97]. Além disso, um estudo recente multinacional europeu com 6,117 participantes registou um maior nível de hemoglobina glicada (HbA1c) em doentes com SAOS grave comparativamente aos doentes sem SAOS [98]. Globalmente, estes resultados levantam a possibilidade da SAOS poder ser um novo factor de risco para a diabetes ou, em alternativa, que a hiperglicémia crónica possa promover a SAOS. Uma análise prospetiva de 1,453 participantes não diabéticos reportou que a SAOS grave está associada a maior risco de diabetes, independentemente da adiposidade [99]. Assim, os clínicos devem avaliar de forma sistemática o risco de SAOS nos doentes com diabetes e, reciprocamente, excluir a presença de diabetes/intolerância à glicose em doentes com SAOS.

Numa meta-análise recente, compreendendo mais de 3,600 com SAOS e mais de 2,100 doentes sem SAOS, foi confirmada a associação entre a SAOS e a **síndrome metabólica** (SM) [100]. O papel fundamental da obesidade central na SAOS e na SM, bem como a associação entre a SAOS e outros traços definidores da SM, como hipertensão, dislipidémia e hiperglicémia, sugere ainda um possível determinante genético comum deste fenótipo. O maior desafio tem sido compreender se a SAOS é um epifenómeno da obesidade ou se é um factor adicional ao risco cardiometabólico já conhecido da obesidade e da SM. Um estudo realizado em doentes japoneses não obesos mostrou que a SAOS está associada à hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia, sugerindo que até mesmo nos indivíduos não obesos com SAOS pode existir SM [101]. Este facto foi confirmado numa meta-análise recente [102], que englobou 13 estudos independentes (com cerca de 8,000 doentes), que demonstrou uma associação significativa entre a SAOS e o aumento do risco de síndrome metabólica, independentemente do IMC.

Face às evidências anteriores, tem-se questionado acerca da existência de uma relação fisiopatológica entre a SAOS e os componentes individuais da SM, porém a relação de causalidade ainda não está completamente provada. Adicionalmente, a coexistência destas duas síndromes representa um peso para os doentes afetados [103, 104] e, por isso, nos doentes com SAOS é importante avaliar a presença da síndrome metabólica ou dos seus componentes, uma vez que a intervenção precoce pode reduzir a morbilidade e a mortalidade. De facto, um estudo recente atestou que a SAOS e a SM estão sinergeticamente associadas à pior função endotelial e, portanto, os doentes que apresentam estas duas condições têm um maior risco de complicações por doença cardiovascular [105].

Por fim, como outra complicação metabólica associada à SAOS, deve ainda ser referida a **esteatose hepática não alcoólica** [106], que é uma manifestação conhecida da resistência à insulina e da SM.

A SAOS pode estar associada a **outras comorbilidades**, como a doença renal [107-109], a epilepsia [110] a esclerose múltipla [111], as cefaleias [112], os distúrbios psiquiátricos [113] e a insónia [114]. A SAOS está também associada ao aumento de incidência de neoplasia [115] e respetiva mortalidade [116], de doença pulmonar obstrutiva crónica [117] e de asma [118]. Revisões recentes revelaram nos doentes com SAOS uma maior incidência de insuficiência respiratória aguda, eventos cardíacos, hospitalização prolongada e no internamento na unidade de cuidados intensivos no período peri operatório [119, 120].

Em síntese, a SAOS é uma doença sistémica associada a várias consequências, o que a torna num problema de saúde pública, devendo a abordagem diagnóstica incluir a pesquisa dessas consequências. Os distúrbios cardiovasculares e metabólicos coexistem frequentemente na SAOS e têm evidenciado consequências clínicas semelhantes. É importante diferenciar a sua responsabilidade relativa nos fenótipos clínicos, caracterizando melhor as vias moleculares partilhadas e específicas.

### **Abordagem terapêutica na SAOS**

Os benefícios do tratamento da SAOS incluem a resolução da obstrução da VAS durante o sono, normalizando o IAH e a saturação da oxihemoglobina, com melhoria da qualidade do sono [121, 122], melhoria clínica e diminuição da morbilidade e mortalidade cardiovascular.

A SAOS não diagnosticada e não tratada conduz a importantes consequências para a saúde. Estas consequências resultam num peso económico significativo para a sociedade [123], o qual poderá ser aliviado com a identificação da doença e a instituição do tratamento. Apesar do tratamento parecer reduzir os custos médicos, como no caso de hospitalizações, existem poucos estudos que esclareçam melhor esta questão (por exemplo [124]). No caso de Portugal, a SAOS tornou-se num importante peso financeiro no Sistema Nacional de Saúde, com despesas em cuidados respiratórios domiciliários de 55,5 milhões de euros/ano, segundo a Administração Central do Sistema de Saúde (em que mais de 50% se deve à ventiloterapia) ([http://www.acss.min-saude.pt/wp-content/uploads/2016/09/Reletorio\\_e\\_Contas\\_2015.pdf](http://www.acss.min-saude.pt/wp-content/uploads/2016/09/Reletorio_e_Contas_2015.pdf)). Outra fonte estima que uma pequena percentagem dos doentes com SAOS são diagnosticados e tratados, prevendo-se um aumento nos custos nos próximos tempos, atendendo a que um maior uso dos sistemas de saúde predispõe ao diagnóstico da SAOS [125].

Tendo em conta que a SAOS é uma doença crónica, a sua abordagem requer acompanhamento a longo prazo e multidisciplinaridade [33]. Existem diferentes opções terapêuticas na SAOS, como estratégias comportamentais, médicas e cirúrgicas, e ainda terapêuticas adjuvantes, as quais podem complementar a opção principal [126]. Inclusivamente, começam a surgir estudos que incluem novas abordagens terapêuticas, como a estimulação do nervo hipoglosso [127, 128], o tratamento com pressão oral [129] e a pressão expiratória positiva nas vias aéreas [130], com resultados preliminares promissores.

Seja como for, o tratamento por pressão aérea positiva (PAP) tem sido a terapia mais recomendada na literatura [126], tendo sido primeiramente descrito por Sullivan em 1981 [131], e continua a ser o tratamento de primeira linha da SAOS [33]. As análises de custo-eficácia suportam fortemente o valor para a sociedade do tratamento com PAP nestes casos, em comparação com os tratamentos aceites para outras condições, como a diabetes [132].

De acordo com as normas de orientação clínica da Direção-Geral da Saúde [133], o tratamento com PAP está indicado na SAOS grave, independentemente da presença ou não de sintomatologia, e na SAOS associada a sonolência diurna excessiva e/ou acompanhada de patologia cardiovascular.

Mas apesar da PAP ser o tratamento de primeira linha, é limitado no seu sucesso porque não é curativo. Requer o uso de um equipamento durante todas as noites, o que pode ser socialmente embaraçoso e incomodativo, para além de necessitar de monitorização regular. Uma revisão sistemática recente da literatura, que englobou 66 artigos [134], incidiu sobre o uso da PAP nos últimos 20 anos (1994 – 2015). Esta revisão demonstra uma taxa de adesão média de 4,6 horas, uma taxa global de não adesão (definida pelos autores como menor do que 7 horas/noite) de 34,1% e que a intervenção comportamental se traduz num aumento modesto da adesão (~1 hora). Esta baixa adesão chama a atenção para a necessidade de revisão do conceito da PAP como terapêutica de eleição da SAOS.

Mesmo assim, o efeito benéfico, sobretudo a nível clínico, da PAP na SAOS e nas suas consequências tem sido muito estudado. Em termos clínicos, a PAP leva a uma melhoria das consequências neurocognitivas, nomeadamente da sonolência diurna [135], dos défices cognitivos e da depressão [136, 137], bem como a uma redução substancial do risco de acidentes rodoviários [138].

Entre os tratamentos disponíveis para a SAOS, a PAP apresenta a evidência mais forte relativamente a um efeito benéfico a nível cardiovascular [70, 77, 139]. A PAP está associada a uma redução na pressão arterial sistólica e diastólica, diurna e noturna, bem como na HTA resistente [140, 141], e um menor risco de morte e hospitalização nos doentes com insuficiência cardíaca [142, 143]. Por sua vez, a PAP diminui a reatividade vascular pulmonar induzida pela hipoxémia [144] e nos

doentes com doença coronária, permite uma proteção contra novos episódios cardiovasculares, definidos como morte cardiovascular, síndrome coronário agudo, hospitalização por insuficiência cardíaca ou necessidade de revascularização coronária [145]. Complementarmente, a PAP diminui a taxa de recorrência dos episódios de fibrilhação auricular [146] e diminui a recorrência desta após ablação [147, 148]. No entanto, um estudo recente (*SAVE – Sleep Apnea Cardiovascular Endpoint Study*), envolvendo 2,717 doentes acerca da eficácia da PAP na redução de eventos cardiovasculares na SAOS, trouxe resultados inesperados [149]. Os doentes com SAOS moderada a grave, com doença cardiovascular concomitante e sob terapêutica com PAP (adesão de 3,3 horas) não apresentaram menor risco de eventos cardiovasculares relativamente aos controlos, apesar de mostrarem uma redução no valor de pressão arterial diastólica e na sonolência diurna e melhoria na qualidade de vida.

O uso precoce da PAP, e com boa adesão, durante a fase aguda do AVC, em doentes com SAOS ligeira a moderada, está associado a uma melhoria das escalas neurológicas logo no 1º mês após o AVC e a menor taxa de mortalidade [150-152].

O efeito da PAP nas alterações metabólicas tem sido amplamente explorado nos últimos 10 anos, mas os resultados são ainda inconclusivos. Alguns estudos mostraram que a PAP não tem impacto na gordura visceral [153, 154]. Aliás, uma meta-análise recente que incluiu mais de 3,100 doentes com SAOS tratados com PAP reportou um aumento do peso e do IMC [155]. Alguns estudos revelaram uma diminuição do colesterol total [156, 157], do rácio colesterol total/HDL [156] e dos triglicéridos [157] nos doentes sob PAP, enquanto outros estudos não mostraram esse benefício [158, 159]. A PAP parece, também, levar a um aumento do colesterol HDL, mesmo na ausência de alteração considerável do peso [160]. O benefício do PAP no metabolismo lipídico foi confirmado por uma meta-análise recente [161].

Vários têm sido os estudos que exploraram a influência da PAP no controlo do metabolismo da glucose e na resistência à insulina, mas têm apresentado resultados contraditórios (revisão em [162]), o que parece decorrer das diferenças metodológicas entre os estudos. Alguns estudos mostraram que o tratamento com PAP melhora a sensibilidade à insulina [163-165], quer em doentes diabéticos [166] quer em não diabéticos [167, 168]. Contrariamente, outros estudos não confirmaram o benefício da PAP na sensibilidade à insulina [157, 169-172], nem no HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of insulin resistance*), modelo da avaliação da homeostase da resistência à insulina [170]. Adicionalmente, uma revisão sistemática recente reportou uma melhoria nos níveis de HbA1c e/ou aumento da atividade da insulina apenas após uso de PAP 3 meses [173]. Feng e colaboradores [166] publicaram em 2015 uma revisão sistemática e uma meta-análise de estudos prospetivos sobre os efeitos do PAP nos indicadores da diabetes nos doentes com SAOS e diabetes

tipo 2 (num total de 128 doentes). Estes autores registaram que o uso de PAP (por menos de 4 meses) não melhora o controlo glicémico (indicado pelo nível de HbA1c) ou o IMC, mas pode levar à melhoria da sensibilidade à insulina nestes doentes. Acresce referir que o uso de PAP limitado a 4 horas/noite pode não ser suficiente para tratar as apneias e hipopneias associadas ao sono REM (*Rapid Eye Movement*), as quais estão associadas aos níveis de HbA1c [174]. Assim parece ser necessário maior uso de PAP (7 horas/noite) para obter uma melhoria significativa nos níveis de HbA1c [174]. Mais recentemente, uma revisão sistemática e meta-análise [175] mostrou que em doentes com SAOS não diabéticos e pré diabéticos (n=965 doentes), a PAP levou a uma diminuição do HOMA-IR e possivelmente a uma redução do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2. É importante reconhecer que o impacto da SAOS no desenvolvimento da diabetes pode, de facto, ser distinto dos seus efeitos no controlo glicémico. Ou seja, a SAOS é um factor de risco independente da diabetes, mas tem um papel menor no controlo glicémico após a instalação da diabetes, o que pode estar na base dos resultados díspares quanto ao efeito da PAP.

Os efeitos da PAP na melhoria dos componentes da SM são, também, controversos, como recentemente sumarizado em duas revisões da literatura [176, 177].

Outros benefícios da PAP verificam-se ao nível de alguns marcadores inflamatórios (proteína C reativa, TNF (*Tumor Necrosis Factor*), interleucina (IL)-6 e IL-8) [178, 179]. Este aspeto é igualmente importante, uma vez que se considera que a inflamação sistémica possa estar na base do processo aterosclerótico, o qual por sua vez está subjacente à morbilidade cardiovascular na SAOS.

Em resumo, a abordagem terapêutica dos doentes com SAOS depende de critérios clínicos e polissonográficos e, na maioria dos casos, a ventilação é o tratamento de primeira linha. Apesar disso, esta terapêutica não só não é curativa, como também são necessários mais estudos para clarificar melhor a sua eficácia sobretudo ao nível dos mecanismos fisiopatológicos e das consequências da SAOS.

### **Mecanismos subjacentes às complicações da SAOS**

A SAOS resulta na alteração de dois sistemas homeostáticos importantes, que são o sono e a oxigenação, com impacto nas funções cardiovascular e metabólica. No entanto, a patogénese das complicações associadas à SAOS não é completamente compreendida e é provavelmente multifactorial, envolvendo um conjunto de mecanismos que incluem a hipóxia intermitente, a fragmentação do sono, a sobre-ativação do sistema nervoso simpático, o *stress* oxidativo, a ativação seletiva de vias moleculares inflamatórias, a disfunção endotelial, a alteração da coagulação e a

desregulação metabólica. Destes mecanismos, tem sobressaído a hipóxia intermitente crónica como estando na base da maioria dos demais mecanismos.

Os doentes com SAOS apresentam episódios repetidos de oclusão da VAS, manifestando-se pela recorrência de apneias e hipopneias durante a noite. A redução da ventilação causa hipóxia alveolar e hipercapnia. Os referidos episódios são também responsáveis pelos ciclos de hipoxémia/reoxigenação, oscilações na pressão intratorácica e despertares. É de notar que os episódios de hipoxémia seguidos de oxigenação são semelhantes aos fenómenos de isquémia/reperfusão [180], os quais por sua vez causam dano devido ao fluxo de espécies reativas de oxigénio durante o período de reperfusão [181]. Esses ciclos de hipóxia intermitente estão subjacentes ao aumento da **atividade simpática**, ao **stress oxidativo** e à **inflamação sistémica** (revisão em [182]). Apesar de recentemente existir evidência de algum papel protetor da hipóxia intermitente na SAOS (revisão em [183]), estes efeitos são cumulativos ao longo do tempo e estão potencialmente na base das suas consequências cardiovasculares e metabólicas (revisão em [182]).

A hipoxémia ativa o **sistema nervoso simpático** [184], ocorrendo nos doentes com SAOS um reajuste deste sistema, com um maior nível de atividade, não só durante o sono fragmentado, mas também cronicamente durante o dia, o que parece ser um factor importante de aumento da morbilidade e mortalidade cardiovascular associada a esta condição [185, 186]. A noradrenalina e a adrenalina plasmáticas e urinárias são frequentemente usadas na investigação clínica para avaliar o estado simpático e, em particular, a determinação urinária reflete a globalidade da excreção das catecolaminas. Alguns estudos sugerem que os níveis de catecolaminas podem ser um marcador da gravidade da SAOS e podem ser usados na monitorização da resposta ao tratamento [187-189]. Atualmente considera-se que a ativação simpática pode induzir, por sua vez, **stress oxidativo** e o inverso também se verifica.

Adicionalmente, a hipóxia intermitente na SAOS está associada à presença de **espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio**. O ambiente celular redox é determinado pelo balanço entre a produção de oxidantes e radicais livres e o nível de agentes redutores. As células têm um sistema preciso que balanceia os pró e os antioxidantes permitindo a presença de níveis baixos de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, que parecem desempenhar um papel ativo em diferentes vias de sinalização (revisão em [190]) e processos biológicos, como o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência celular. Quando as espécies reativas de oxigénio/nitrogénio ultrapassam a capacidade antioxidante celular, ocorre uma condição designada de **stress oxidativo/nitrosativo**, causando dano celular e modificações oxidativas de diferentes macromoléculas, incluindo lipídios, DNA (*Desoxiribonucleic Acid*) e proteínas. Os danos nos lipídios resultam na peroxidação lipídica, o que contribui para a disfunção vascular e aterogénese [191]. As lesões ao nível do DNA traduzem-se em alterações do

material genético, o que pode desencadear a mutagénese e o desenvolvimento de neoplasia [192]. A oxidação dos resíduos de aminoácidos das proteínas, frequentemente resíduos de cisteína, leva à formação de carbonis proteicos, com consequente alteração da estrutura proteica e da sequência dos aminoácidos, formação de pontes entre proteínas e a fragmentação das mesmas. Por sua vez, as modificações das proteínas estão envolvidas em processos de sinalização e doenças (revisão em [193]).

Quanto às espécies reativas propriamente ditas, estas são moléculas multifacetadas que podem ser classificadas em espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio (*reactive oxygen species* - ROS e *reactive nitrogen species* - RNS, respetivamente). Os oxidantes mais comuns são as espécies reativas de oxigénio, as quais são geradas por enzimas intracelulares durante o normal metabolismo aeróbio. A principal ROS é o anião superóxido, o qual resulta da redução do oxigénio, mas como é instável, forma outras moléculas tóxicas como o peróxido de hidrogénio ou o radical hidroxilo (revisão em [194]). Já não é recente a noção de que as ROS e as RNS desempenham um papel importante nas complicações cardiovasculares [195].

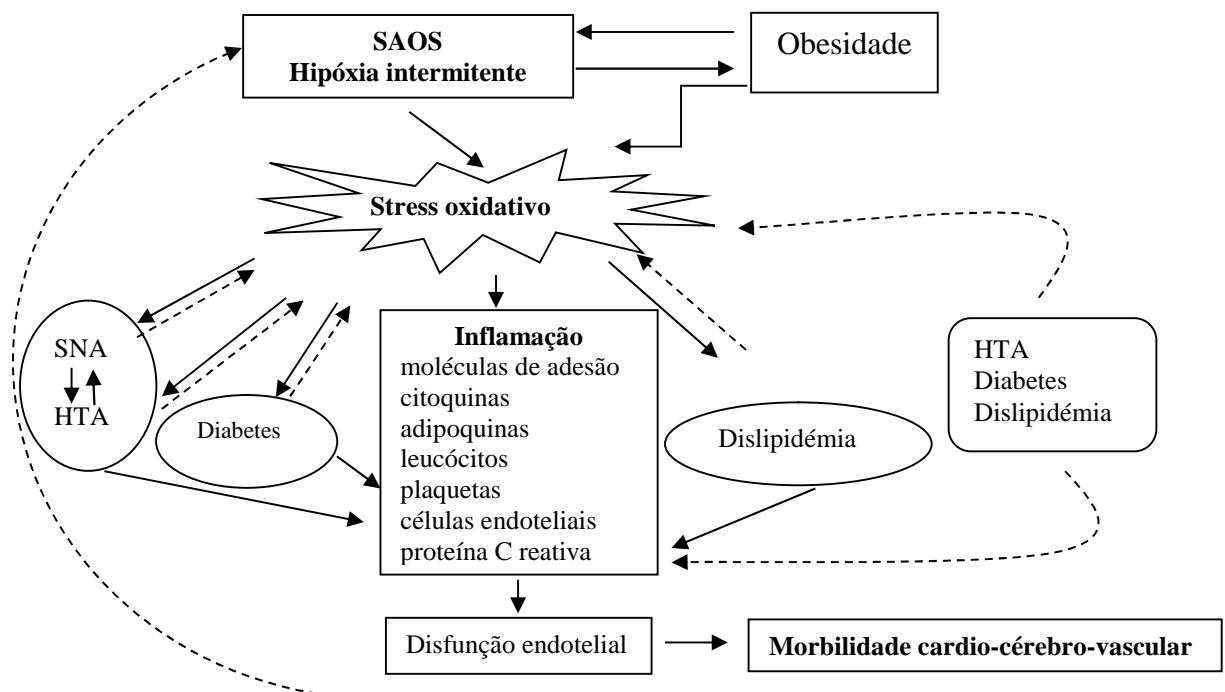
Na SAOS, os ciclos de hipóxia seguidos de reoxigenação promovem a formação de espécies reativas de oxigénio e vários estudos apontam para a existência de um aumento do *stress* oxidativo [156, 180, 196-199]. Por sua vez, este desencadeia uma cascata de eventos, que culminam na inflamação, disfunção endotelial e aterosclerose (revisão [200]). Estas linhas de evidência apontam para o facto do *stress* oxidativo ser o paradigma unificador da morbilidade cardiovascular na SAOS e também na promoção dos distúrbios metabólicos que lhe estão associados (revisão em [201]). É de salientar ainda que o *stress* oxidativo continuado e a inflamação resultante estão, também, na base da iniciação e progressão da neoplasia [202], uma patologia emergente associada à SAOS [115, 203, 204].

Além disso, estudos revelam que nos doentes com SAOS ocorre uma diminuição da capacidade antioxidante [205-210]. Mecanismos protetores adicionais foram, também, reportados na SAOS [211], sendo estes regulados pela hipóxia e dependendo da gravidade da doença [212]. O estudo recente de Passali e colaboradores [213] assinalou um aumento da produção de marcadores de *stress* oxidativo nos doentes com SAOS e sem comorbilidades, que se sabe serem promotoras desse *stress*, como a diabetes, obesidade, asma, polipose nasal e HTA. No entanto, outros estudos, alguns dos quais incluindo também uma população homogénea de doentes com SAOS e sem comorbilidades, não mostraram evidência de aumento de *stress* oxidativo na SAOS [214-216]. Apesar destes últimos estudos, existe um consenso emergente de que a SAOS é um distúrbio oxidativo, que melhora com o tratamento (dispositivos orais [217, 218] ou PAP [178, 219, 220]). No entanto, também há registo de que a PAP não altera os níveis das enzimas antioxidantes [199]. Adicionalmente, a suspensão da

PAP em doentes com SAOS moderada/grave não leva a um aumento das ROS, mas sim a um aumento da superóxido dismutase, provavelmente indicando um aumento da capacidade anti-oxidante [221].

O *stress* oxidativo e a **inflamação** são dois mecanismos que estão interligados, podendo um levar à exacerbação do outro [222] (figura 6). Assim, em resposta à hipoxia intermitente, as células sanguíneas e endoteliais sofrem ativação e apresentam um fenótipo pro-inflamatório, o qual leva ao aumento de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e ROS suplementares [223-225]. Este fenótipo das células sanguíneas em circulação promove também a adesão às células endoteliais, favorecendo a disfunção endotelial na SAOS [200, 226, 227]. Todos estes mecanismos contribuem para o risco aterosclerótico [228], o qual constitui o prelúdio da disfunção multi-orgânica na SAOS. Assim, a hipóxia intermitente promove as alterações a nível molecular, celular e tissular descritas e que estão na base das consequências associadas à SAOS (revisão em [229]) (figura 2).

Em resumo, têm sido realizados vários estudos sobre os mecanismos subjacentes à SAOS e às suas consequências, com particular ênfase na inflamação e no *stress* oxidativo. Contudo, continuam por identificar moléculas pertencentes a essas vias e que possam servir de biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico.



**Figura 2:** Papel do *stress* oxidativo e da inflamação na SAOS e nas comorbilidades associadas (adaptado de [183]). Legenda: HTA: hipertensão arterial; SNA: sistema nervoso autónomo.



## Necessidade de um biomarcador para a SAOS

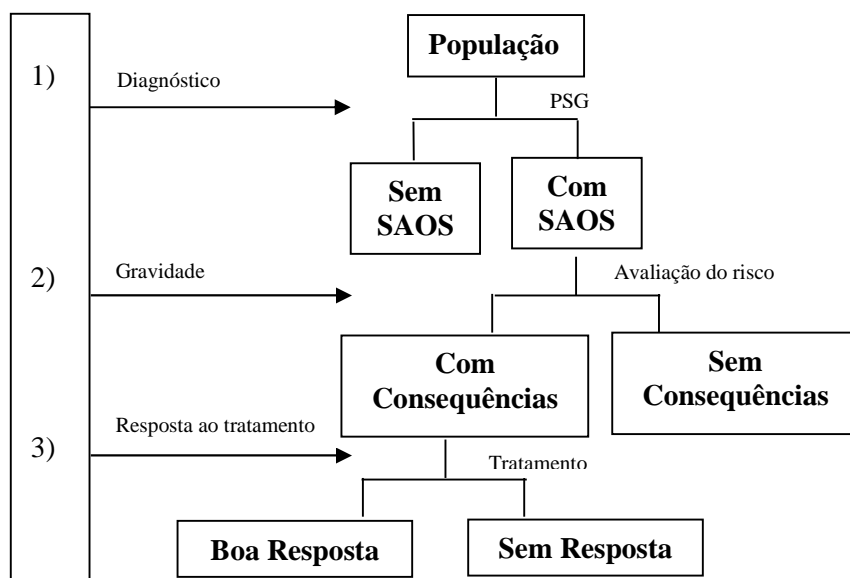
A SAOS é uma condição com elevada prevalência e tem emergido como importante factor de risco de outras doenças, como as doenças cardiovasculares e metabólicas. O seu diagnóstico definitivo baseia-se na realização de uma PSG, que é um exame complementar laborioso e exigente em termos de recursos humanos e técnicos. Esta situação, aliada ao insuficiente reconhecimento da SAOS pela comunidade médica, tem contribuído para o subdiagnóstico desta entidade clínica [230]. Adicionalmente, não existe uma definição perfeita da SAOS, uma vez que existem métricas que se relacionam de forma frágil com as consequências para a saúde. Apesar disto, existe evidência crescente que suporta a importância do diagnóstico e tratamento precoce da SAOS, pela necessidade de se evitar as suas consequências. Por sua vez, o tratamento de primeira linha da SAOS consiste no uso de dispositivos PAP durante o sono, mas as suas repercussões a nível fisiopatológico são, ainda, tema de grande debate.

Estes factos, na sua essência, levantam a necessidade de procurar novos instrumentos que auxiliem o diagnóstico, o estabelecimento do prognóstico e a avaliação da resposta ao tratamento, com o objetivo de prevenir as consequências da SAOS. Recentemente, tem surgido a noção da necessidade de instituição de uma terapêutica personalizada nos doentes com SAOS, o que passa possivelmente pela identificação de biomarcadores. Efetivamente, a descoberta de biomarcadores da SAOS pode ser um passo crítico na abordagem desta entidade clínica, uma vez que pode ter o potencial de fornecer informação relacionada com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no diagnóstico, na gravidade, no prognóstico e na resposta ao tratamento. Com base nalguns estudos genéticos já desenvolvidos, tem sido sugerido que a SAOS não é provavelmente uma condição simples associada a alguns genes ou proteínas, mas sim uma manifestação complexa de múltiplas vias interconectadas e numerosas alterações moleculares [231], o que pode tornar complexo o processo de identificação de biomarcadores.

A definição de biomarcador sofreu diversas evoluções. O **biomarcador** é definido como uma molécula biológica, encontrada no sangue, noutros fluídos ou tecidos, e que é considerada como sinal de processos normais ou anómalos, de determinada condição ou doença [232]. No contexto da SAOS, a investigação de biomarcadores tem-se focado em 3 áreas: 1) os biomarcadores de diagnóstico, os quais discriminam os indivíduos com e sem doença; 2) os biomarcadores de gravidade, os quais diferenciam os indivíduos em risco de desenvolver ou que já apresentam consequências ao nível dos órgãos-alvo; 3) os biomarcadores de resposta à terapêutica, os quais

identificam os doentes com risco de SAOS residual ou os indivíduos cuja resposta parcial ao tratamento os coloca em risco de morbilidade (figura 3).

### Biomarcadores



**Figura 3:** Áreas de investigação no âmbito dos biomarcadores para a SAOS. Adaptado de [233].

Recentemente, Shih e Malhotra descreveram os requisitos de um biomarcador ideal [234]. Para estes autores, o biomarcador ideal com utilidade diagnóstica na SAOS necessita de ser sensível e específico, o que na teoria poderia permitir estabelecer prioridade nos doentes a aguardar PSG. Para um biomarcador ser útil na avaliação da resposta ao tratamento, deverá estar envolvido na patogénese das complicações e deve responder ao tratamento. Se o biomarcador pertencer à via causal das complicações da doença, a sua alteração em resposta à terapêutica pode ser preditiva da redução da ocorrência de complicações. Neste caso, o biomarcador pode ser usado em ensaios clínicos como medida das consequências da doença. Aspectos adicionais devem incluir o baixo custo e a facilidade de uso, bem como a capacidade de avaliar simultaneamente várias vias patogénicas. Na prática, um biomarcador com estas características é difícil de encontrar e representa um amplo campo de investigação da atualidade. Tradicionalmente, no contexto da SAOS, a investigação de biomarcadores tem-se focado na procura de candidatos a biomarcadores (*biased*), o que é feito através da sua determinação bioquímica direcionada. A investigação feita por esta via convencional tem-se centrado na procura individualizada de um ou vários biomarcadores específicos em cada estudo desenvolvido.

Através desta via, nos últimos anos foram apontados possíveis candidatos a biomarcadores, como os marcadores de inflamação, metabólicos e de *stress* oxidativo.

### Marcadores de inflamação

Apesar do mecanismo exato responsável pelo aumento dos marcadores de inflamação na SAOS ser desconhecido, a privação do sono e a hipoxémia parecem ser importantes fatores causais. Mais, o tecido adiposo pode produzir marcadores de inflamação, como a proteína C reativa, TNF- $\alpha$  e IL-6 [235-237], e sendo a obesidade uma comorbilidade comum da SAOS, permanece por esclarecer qual a entidade clínica responsável pela produção destes marcadores inflamatórios.

A relação entre a SAOS e os marcadores inflamatórios é, na maior parte das vezes, controversa. São exemplos a **Proteína C Reactiva (PCR)** (revisão em [238]), o **Factor de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ )** (revisão em [238]), a **Interleucina (IL) -6** (revisão em [238]), a **IL-8** (revisão em [179], [239]) e o **Fibrinogénio** [240, 241].

Também relativamente ao tratamento com PAP, os resultados são controversos para a PCR [242, 243], para o TNF- $\alpha$  (revisão em [179]) e para o fibrinogénio [187, 244,].

A adesão dos leucócitos em circulação às células endoteliais é considerado um importante passo no desenvolvimento da aterosclerose [245] e este processo é potenciado pelas moléculas celulares de adesão, em resposta às citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 [246]. Os mediadores potenciais dessa adesão incluem **ICAM-1** (*intercellular adhesion molecule-1*), **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule-1*) e **L-selectina** [247]. Existe evidência de aumento destas moléculas na SAOS [238, 248, 249] e uma diminuição das mesmas após tratamento com PAP [250, 251].

### Marcadores metabólicos

Alguns autores reportaram que em doentes não diabéticos com SAOS, a **HbA1c** estava positivamente relacionada com o índice de despertares e a percentagem de sono com saturação da oxihemoglobina inferior a 90% e de forma negativa com a saturação média da oxihemoglobina, e que este efeito era independente da obesidade [252, 253]. Priou e colaboradores comprovaram, também, uma associação positiva entre a HbA1c e a gravidade da SAOS [254]. Resultados de duas meta-análises mostraram não haver influência significativa da PAP na HbA1c. Assim, a HbA1c pode ser um biomarcador potencial da SAOS, pelo menos para alguns doentes, apesar de no momento atual o seu uso clínico estar limitado ao diagnóstico e/ou monitorização da diabetes.

Existe também controvérsia relativamente à ligação entre a SAOS e outros marcadores metabólicos, como a **Leptina** [255-258], a **Adiponectina** [255, 256] e a **Resistina** [257, 259]. De

igual forma, também não existe consenso acerca da resposta destes marcadores metabólicos à PAP (Leptina [258, 260, 261], Adiponectina [257] e Resistina [257, 259]). Por sua vez, a **Grelina** encontra-se aumentada na SAOS e diminui com a PAP [257, 261].

### Marcadores de stress oxidativo

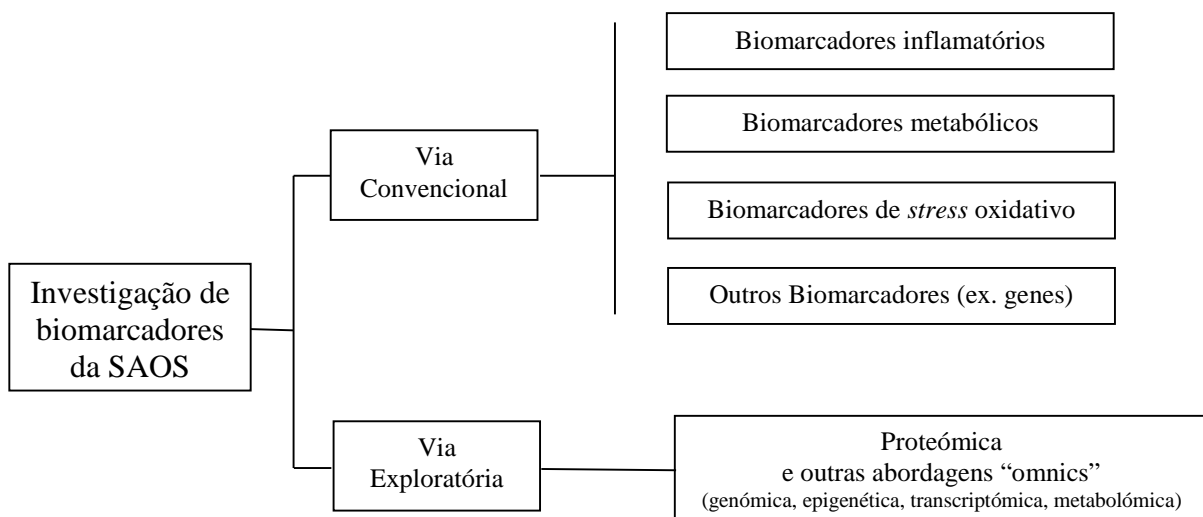
O *stress* oxidativo tem sido estudado na SAOS devido à sua relação com a aterosclerose e doença cardiovascular, emergindo como componente importante na sua patogénese. O interesse clínico tem incidido sobre o **8-isoprostano**, **Óxido Nítrico** [94, 262, 263], **Malonaldeído** [264], **Paraoxonase** [208, 265], **Cisteína** [266], **Tiorredoxina** [211, 212] e **Amilóide** [267, 268].

Salienta-se um marcador de *stress* oxidativo que tem merecido nos últimos anos destaque na investigação e que é a **Homocisteína**. Este marcador é um aminoácido intermediário formado durante a conversão metabólica da metionina em cisteína. Esta via tem sido interessante de estudar pelas suas propriedades aterogénias e protrombóticas, para além da modificação potencial pelas vitaminas folato e piridoxina (B<sub>6</sub>). Estudos epidemiológicos têm reportado a homocisteína como um factor de risco independente das doenças cardiovasculares [269-271], apresentando uma relação estreita com o seu prognóstico [269]. Os níveis elevados de homocisteína têm sido associados ao aumento do risco de doença coronária, HTA e aterosclerose [270]. Adicionalmente, o tabaco influencia os níveis de homocisteína, sendo um possível factor confundente da relação entre a homocisteína e a doença cardiovascular [272]. Numa meta-análise recente foi reportado que os níveis plasmáticos de homocisteína são maiores nos doentes com SAOS em comparação com controlos [273]. No entanto, estudos mais antigos questionam a relação entre a homocisteína e a SAOS (por exemplo [274]). Também numa meta-análise recente foi reportado que nos doentes com SAOS os níveis de homocisteína são consideravelmente reduzidos pela PAP [275].

Uma revisão acerca de vários possíveis biomarcadores na SAOS [276] atestou que estes eram influenciados por vários fatores como a idade, o género, a etnicidade e as comorbilidades, o que tem impossibilitado a identificação de um único biomarcador para todos os doentes com SAOS.

Tal como exposto, apesar de terem emergido vários candidatos a biomarcadores, nenhum se revelou suficientemente específico e/ou sensível da SAOS. E portanto, até ao momento, não existem biomarcadores úteis no diagnóstico, na abordagem da doença ou das suas consequências. Como tal, é necessária investigação adicional na procura de um biomarcador, ou uma combinação de biomarcadores, para a SAOS com utilidade no estabelecimento da gravidade e no desenvolvimento de estratégias de intervenção, isto é, de resposta ao tratamento.

Alternativamente, a pesquisa de biomarcadores pode ser feita segundo uma estratégia exploratória. (figura 4). Assim, na última década, começou a ganhar mais expressão a investigação de biomarcadores através do rastreio “omics” (*unbiased*). Por esta última abordagem, a investigação tem incidido em domínios específicos da maquinaria celular/tissular com o objetivo de deteção de genes e da sua expressão (genómica e epigenómica), de mRNA (*messenger Ribonucleic Acid*) (transcriptómica), de metabolitos (metabolómica) e de proteínas (proteómica) numa amostra biológica. De facto, a aplicação das tecnologias “omics” tem permitido a deteção de pequenas alterações nas proteínas e nos perfis metabólicos em amostras biológicas, como os tecidos, o plasma, a saliva, a urina, entre outros, melhorando o conhecimento das doenças e contribuindo para uma medicina personalizada de precisão. Em paralelo, a quantidade importante de informação gerada veio a exigir a cooperação da bioestatística e da bioinformática. Assim, face à inexistência atual de um ou vários biomarcadores de diagnóstico, de gravidade e/ou de resposta à terapêutica para a SAOS, a proteómica surge como uma metodologia alternativa à determinação bioquímica tradicional para a descoberta dos referidos biomarcadores, atendendo a que na fase exploratória ou de descoberta permite analisar em simultâneo inúmeras proteínas diferencialmente expressas.



**Figura 4:** Vias de investigação de biomarcadores para a SAOS (convencional e exploratória). Adaptado de [233].

### **Proteômica aplicada à SAOS na descoberta de marcadores**

A proteômica consiste no estudo em larga escala do proteoma, nomeadamente da expressão proteica do genoma, com particular análise da sua estrutura e função [277]. A proteômica clínica é um campo emergente da proteômica que tem por objetivo identificar perfis proteicos de determinada doença, ou seja, biomarcadores, para melhor compreender a própria doença, auxiliando no seu diagnóstico e abordagem [278]. Assim, a proteômica pode tornar-se numa ferramenta potente na descoberta da expressão proteica/biomarcadores relacionados com a SAOS, sendo as suas consequências um campo particularmente apetecível. O uso de tecnologia proteômica, antes e após o sono ou antes e após o tratamento, pode ajudar na definição de potenciais biomarcadores de gravidade e/ou de resposta à terapêutica para a SAOS.

Neste sub-capítulo a autora apresenta um artigo de revisão de sua autoria, onde faz referência ao estado da arte sobre a proteômica, com o objetivo de apresentar as vantagens de aplicar esta abordagem na descoberta de novos biomarcadores na SAOS. No mesmo artigo apresenta uma revisão dos estudos proteômicos realizados, até ao momento, na população pediátrica e adulta, levados a cabo com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores aplicados ao diagnóstico e tratamento desta entidade clínica.

#### ***Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea.***

(A Feliciano, Sleep Med. 2015 April; 16(4): 437–445)



## HHS Public Access

Author manuscript

Sleep Med. Author manuscript; available in PMC 2015 October 01.

Published in final edited form as:

Sleep Med. 2015 April ; 16(4): 437–445. doi:10.1016/j.sleep.2014.11.014.

## Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea

Amélia Feliciano<sup>a,b,1</sup>, Vukosava Milic Torres<sup>b,1</sup>, Fátima Vaz<sup>b</sup>, Ana Sofia Carvalho<sup>b</sup>, Rune Matthiesen<sup>b</sup>, Paula Pinto<sup>a</sup>, Atul Malhotra<sup>c,d</sup>, Cristina Bárbara<sup>a</sup>, and Deborah Penque<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E., Lisboa, Portugal

<sup>b</sup>Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge I.P., Lisboa, Portugal

<sup>c</sup>Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

<sup>d</sup>Division of Sleep Medicine Sleep Disorders Research Program Brigham & Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

## Abstract

Obstructive sleep apnea (OSA) is an underdiagnosed common public health concern causing deleterious effects on metabolic and cardiovascular health. Although much has been learned regarding the pathophysiology and consequences of OSA in the past decades, the molecular mechanisms associated with such processes remain poorly defined. The advanced high-throughput proteomics-based technologies have become a fundamental approach for identifying novel disease mediators as potential diagnostic and therapeutic targets for many diseases, including OSA. Here, we briefly review OSA pathophysiology and the technological advances in proteomics and the first results of its application to address critical issues in the OSA field.

## Keywords

Obstructive sleep apnea; Biomarkers; Proteomics; Mass spectrometry; Lung; Metabolic disorders

## 1. Obstructive sleep apnea syndrome

Obstructive sleep apnea (OSA) is a common sleep-related breathing disorder which is characterized by recurrent occurrence of partial or complete closure of the upper airway during sleep, despite ongoing efforts to breathe [1]. These obstructive events result in interruption of sleep with frequent arousals, loss of REM sleep and slow-wave sleep, cyclical deoxygenation/reoxygenation, and repeated changes in intrathoracic pressure with

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\*Corresponding author. Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge I.P., Lisboa, Portugal. Tel.: +217508137; fax: +217526410. [deborah.penque@insa.min-saude.pt](mailto:deborah.penque@insa.min-saude.pt) (D. Penque).

<sup>1</sup>Both authors contributed equally to this paper.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

The ICMJE Uniform Disclosure Form for Potential Conflicts of Interest associated with this article can be viewed by clicking on the following link: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2014.11.014>.

episodic hypercapnia [2–4]. Symptoms for OSA are multiple and include snoring, excessive daytime fatigue, apneas while sleeping, morning headaches, concentration problems, forgetfulness, depression, and sexual dysfunction, among others [1–3]. The majority of patients with OSA remain undiagnosed since most of them only come to the attention of a clinician when they complain of daytime sleepiness or when their bed partners report loud snoring or witnessed apnea episodes. Epidemiological studies have indicated that OSA affects 6–13% of the adult population [5] and 1–4% of the pediatric population [6]. The prevalence of OSA is much higher, eg, 50%, in patients with cardiac or metabolic disorders than in the general population [5]. Untreated OSA worsens quality of life and brings longterm consequences, which include cardiovascular disease hypertension, diabetes, obesity, stroke, depression, and a variety of metabolic disorders. Major risk factors that contribute to OSA pathogenesis include aging, male sex, and obesity. About 60–70% of patients with OSA are obese, and obesity is the most common metabolic disorder [7–10]. The pathophysiological mechanisms of OSA are both complex and incompletely understood, with differences between afflicted adults as compared to children. OSA is associated with adenotonsillar hypertrophy, craniofacial disorders, lymphoid tissue growth, upper airway inflammation, and/or neuromuscular factors [5,6,11].

The definitive diagnosis of OSA currently requires an overnight polysomnographic laboratory-based polysomnography (PSG), which is expensive and cumbersome [12]. Home unattended study using a portable sleep monitor has been encouraged, but 56% of these cases still require confirmation by laboratory study [13].

The presence and severity of OSA is usually based on PSG, namely by apnea–hypopnea index (AHI) (consisting of the sum of apneas and hypopneas per hour of sleep) or by the respiratory disturbance index (RDI) (consisting of the sum of apneas, hypopneas and respiratory effort related arousals per hour of sleep). Adult patients can be classified as disease free ( $AHI < 5/h$ ), mild ( $AHI \geq 5$ , but  $< 15/h$ ), moderate ( $AHI \geq 15$ , but  $< 30/h$ ), or severe OSA ( $AHI \geq 30/h$ ) [14]. However, the hypopnea definition criteria are not consensual, which can result in highly variable AHI values.

Consequently, potentially classifying symptomatic patients who would benefit from treatment are not meeting treatment criteria for OSA. Moreover, no current established threshold level for AHI exists that indicates the need for treatment [14–16].

The continuous positive airway pressure (CPAP) is considered the first line treatment in OSA, reducing co-morbidities and associated societal consequences such as accidents and cognitive impairment. However, residual sleepiness may persist in some patients and most chronic consequences of OSA may not be fully reversed by CPAP treatment [17–20].

Although significant progress has been made over the past few decades, OSA is still a highly underdiagnosed disorder causing deleterious effects on human health. Early identification of OSA in patients by a simple and inexpensive point-of-care screening test is urgently needed to prevent OSA consequences. To better understand the disease complexity, the molecular factors contributing to the basic mechanisms underlying OSA and OSA bidirectional association with neurocognitive and cardiometabolic dysfunctions must be elucidated. Identification of early and predictive biomarkers of OSA can be a useful tool in



its global strategy, not only at the level of diagnosis, facilitating timely screening but also at the level of prognosis and therapy monitoring, contributing to a better understanding and prevention of OSA and OSA-associated disorders. ‘Omics’-based strategies such as proteomics have the potential to revolutionize sleep medicine and boost understanding of pathophysiological pathways of OSA. Proteomics approaches could be crucial in the identification of new OSA diagnostic and prognostic biomarkers, which could subsequently lead to the development of novel therapeutic strategies for the treatment of this disease [21].

In this review we are highlighting recent technological advances in proteomics and presenting an up-to-date overview of achievements of the proteomics approach in the study of OSA syndrome.

## 2. Proteomics-based technologies

Proteins are codified by genes to play different roles in cell/tissue/organism (eg, cell-based structures, enzymes, signaling factors, hormones). There are, however, more proteins, probably up to one million, than their corresponding codifying genes (20,500) in humans. Several proteins can be generated from only one gene by alternative splicing of RNA (the gene messenger) and after translation proteins can be modified by up to 400 types of posttranslational modifications (PTMs) (eg, phosphorylation, glycosylation, acetylation), generating different proteoforms with probably different protein–protein interactions and functions at different cellular/tissue locations [22]. Alterations in protein sequencing (mutations in genes) but also in protein abundance and PTMs can modulate/dysregulate its function and be associated with a disease state, drug, or environmental response.

Proteomics is a large-scale discovery strategy (see Fig. 1), which refers to the set of technologies applied to explore the proteome, allowing evaluation of hundreds to thousands of proteins at certain times and under certain conditions [23]. The benefits of proteomics are to obtain information regarding changes in protein abundance, protein proteoforms (genetics and PTMs), protein–protein interactions in a cell, tissue, or organism that can be crucial to understanding the true molecular phenotype of a disease, which may also uncover disease biomarkers and disease targets for new drug development [24].

In the last decade different proteomics-based technologies have been developed, enabling simultaneous assessment and detection of large numbers of proteins in biological samples. In disease biomarker discovery, proteomics have been popular in blood, either on plasma, serum or blood cells. Proteomics in biological fluids such as urine, bronchial lavage or aspirate, and tissues like nasal epithelia have also been considered in proteomics study diseases [25,26]. Globally, the protein profiling of biological samples using proteomic approaches is challenging due to the abundance and diversity of proteins. Proteins exhibit an enormous dynamic range of concentration in biological systems, making identification and quantification problematic especially for candidate biomarkers presented at low-abundance in a complex sample [27]. Proteins cannot be amplified as DNA prior to measurement, therefore ultrasensitive techniques are needed to measure and analyze proteins that are mostly at low concentrations in a complex mixture or when samples themselves are scarce as the clinical samples usually are.

Proteomics technologies have been in constant development. However, the most popular procedures are two-dimensional gel electrophoresis (2-D gel) and liquid chromatography (LC) for protein separation, both followed by tandem mass spectrometry (MS/MS) for protein identification (Fig. 1). For either case, proteins should be first extracted from biological samples using compatible biochemical methods, eventually involving fractionation or enrichment procedures, known by sample preparation [28].

### 2.1. 2-D gel approach

In the 2-D gel approach the extracted proteins are separated by their isoelectric point (pI) (first dimension) and then by their molecular weight by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (second dimension). After electrophoresis, gels are stained (eg, Coomassie Blue, silver staining) and the developed 2-DE pattern images showing thousands of proteins are captured by a scanner and analyzed by computer assistance for quantification. The protein spots showing significant differences (lower or higher abundance or presence or absence) between disease and control are excised from gels for further MS identification. The limitations of 2-D gel are associated with its inability to resolve all proteins present in a sample due to differences in protein solubility or hydrophobicity, wide range in protein expression levels (high-versus low-abundance proteins), presence of too basic or acidic proteins that exceed the pH range capacity, or SDS-PAGE upper or lower molecular size gel limits. Difference gel electrophoresis (DIGE) [29] is an improved modification of 2-D gel, in which controls and diseased samples pre-labeled with different fluorescent CyDyes can be analyzed on a single gel together with an internal standard (the sum of all disease/control CyDye-labeled samples in one), reducing experimental variation and increasing sensitivity and protein detection by up to five orders of magnitude [30]. The 2-D gel patterns can be visualized for each CyDye-labeled sample (disease/control) using specific fluorescence scanners for further computer-based quantification and spot excision for MS identification (Fig. 1).

### 2.2. Shotgun proteomics (LC/MS/MS)

In shotgun proteomics, the extracted proteins are digested, typically with trypsin, and the produced peptides separated by LC such as strong anion exchange combined with reverse-phase chromatography and fractions analyzed by an online tandem mass spectrometer for peptide and protein identification (Fig. 1). Initially applied for full identification and characterization of proteomes, the shotgun approach was soon extended to quantitative and comparative studies in biomarker discovery, due to the introduction of stable isotope labeling strategies like ICATs, stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), and more recently, isobaric tags such as iTRAQ and tandem mass tags (TMT) for relative and absolute quantification [28]. In brief, these reagents use ‘tags’ of different masses to label differentially proteins from control or disease proteins, which are then pooled and analyzed via MS to identify and quantify peptides and hence proteins.

Multiplexed analysis allowing differentially labeled samples being simultaneously measured by MS is the main advantage of these stable-isotope-labeled methods. The limitations are related to incomplete labeling, variability in chromatographic runs, complex sample preparation, need for a higher protein concentration and, not least, higher costs. Due to these shortcomings, label-free quantitative proteomics have become an attractive method. This is

usually based on a spectral counting approach, which implies a counting and comparison of the number of fragment-ion spectra (MS/MS) acquired for pipettes of a given protein based on the empiric observation that higher abundance of a particular protein in a sample is related to higher number of corresponding peptides MS/MS spectra [31,32]. Although label or label-free LC-MS/MS methods still suffer from some issues with reproducibility and dynamic range, these methods have been shown to provide increased proteome coverage compared to 2-D gels. Nevertheless, comparative studies between 2DE-MS and LC-MS/MS have shown limited overlapping among proteome identifications suggesting the complementary nature of these approaches [33].

Although less popular than the 2D-gel or LC/MS/MS approaches, surface enhancer laser desorption ionization time of flight MS technology (SELDI-TOF) and capillary electrophoresis coupled MS (CE-MS) have been also used for disease biomarker discovery, including OSA.

### 2.3. SELDI-TOF

SELDI-TOF combines retention of proteins by adsorption or affinity chromatography on a solid-phase protein chip surface that can be further analyzed by MS. Initially, this technology only provided MS spectra profiling without protein identification. New ProteinChip interface coupled to tandem mass spectrometer was recently developed allowing direct sequencing of peptides <6000 Da. However, further confirmation by antibody-based methods (ie, western blot or ELISA) or antibody pull-down with subsequent detection by SELDI-TOF-MS is still recommended [34] for confident protein identification.

### 2.4. CE-MS

In CE-MS, instead of separations by LC, protein extracts, usually body fluids, are separated by CE prior to MS identification. Although interfaced with MS, direct protein sequencing could be a challenge due to limited loading capacity of the CE [35].

### 2.5. Target proteomics

In contrast to those above technologies which operate on an unbiased mode discovering what proteins can be detected and quantified in a sample, an alternative method, known as target proteomics, has been developed as a biased approach testing whether a given protein or a set of proteins is measurable in a particular sample [36–38]. This target proteomics is based on the selected-or multiple-reaction-monitoring (SRM/MRM) technology, in which the mass spectrometer is programmed to pre-select and analyze specific peptides generated from proteins of interest. This requires that relevant proteins for a given sample or disease be determined a priori, which can be a limitation for biomarker discovery studies. Target proteomics has been used very successfully for verification/validation of the data obtained in the discovery phase (see below).

### 2.6. Verification phase

Whatever the proteomic platform approach used, hundreds to thousands of biomarker candidates can be generated but few of them may warrant assessment in a time-consuming and costly large-scale clinical validation trial (Fig. 1). In a biomarker development pipeline,

experimental design, prioritization, and verification are crucial early stages in the selection of the most promising candidates for clinical validation and translation to a specific clinical application [39,40].

A better understanding of the disease state and the putative proteins or pathways involved in the process, taking into account their functional relevance to the cell/tissue or biofluid where they were identified as altered during the discovery phase, would help to develop meaningful criteria for prioritizing candidates for the further validation stage [26,40]. Methods based on immunoaffinity such as western blotting, ELISA, immunocyto/ histochemistry, and more recently, SRM-based methods are the most popular in the verification stage (also referred to as assessment of performance when any candidates are verified by an orthogonal method, ie, other than that one used in the discovery phase) (Fig. 1). The relevance of the verification stage is reflected by the fact that for many proteomics journals of high impact, it is a mandatory requirement for reporting of clinical biomarker studies.

To help improve the overall success of the biomarker discovery pipeline, an important statistical framework for the design of biomarker discovery and verification studies was recently generated from the workshop entitled “Experimental Design Considerations in Research Studies Using Proteomic Technologies” with the participation of U.S. Food and Drug Administration (FDA) [41]. The ultimate goal of this statistical approach is to set clinical relevance and appropriate biospecimen sample size for discovery and verification stages prior to the clinical validation stage, contributing to making protein biomarker discovery from the bench to the clinic quicker and more successful. However, there is still a need for computational methods and algorithms allowing for consistent analysis and interpretation of proteomic data using statistical principles.

## 2.7. Mass spectrometry

Mass spectrometry measures the mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) of ionized molecules such as proteins/peptides and produces spectra containing  $m/z$  values versus intensity count. Matrixassisted laser desorption/ionization (MALDI) and Electrospray ionization (ESI) are the two most common techniques to volatilize and ionize the proteins or peptides for subsequent mass spectrometric analysis. MALDI-MS is mostly used to analyze relatively simple peptide mixtures (eg, from 2-D gel protein spots). Samples are deposited on a MALDI plate, left to dry with a crystalline matrix to be ionized via laser pulses. ESI ionizes the analytes out of a solution coming from an LC system. Integrated LC systems with ESI-MS systems (LC-MS) are preferentially used for analysis of complex samples. There are different types of mass analyzers, with different advantages/disadvantages, such as time-of-flight (TOF), ion trap, quadrupole, Fourier transform ion cyclotron (FT-MS), and orbitrap [42].

Fig. 2 outlines a frequently used strategy (bottom-up proteomics) for identifying potential novel biomarkers. The tryptic peptides generated from protein digestion are separated by LC and online injected into the mass spectrometer, which employs two stages of mass analysis (tandem MS) to identify peptides used subsequently to infer protein identification. Peptide sequencing is achieved by matching the tandem mass spectra derived with theoretical tandem mass spectra generated from *in silico* digestion of a protein sequence database (Fig.



2). Protein inference is often complicated by the fact that many tryptic peptides are shared among proteins. Moreover, mass accuracy used for database-dependent search, the specific sequence database used for the search, the filtering criteria such as minimum number of peptides identified, and False Discovery Rate (FDR) cutoff can also dramatically change the proteins and peptides identified in the final report and can be a reason for lost information and low reproducibility when validation is performed in another laboratory that uses a different data analysis pipeline [43,44]. Besides protein inference, the protein state is another issue in bottom-up proteomics, which often does not provide accurate information on the site location of PTMs, and even if the site location is well determined the quantitative value cannot be directly linked to quantitative values of protein states [45]. Based on literature and our preliminary data, we hypothesize that specific PTMs could be involved or linked to OSA. We already identified several oxidation and nitrosylation products that, in general, display a regulatory difference between snorers and OSA patient groups. An example of a nitrosylated peptide from hemoglobin subunit alpha identified by MS/MS is provided in Fig. 3. This was accomplished by using state-of-the-art mass spectrometers and by using an open search for modifications when matching MS/MS spectra against sequence databases [46–48].

### 3. Proteomics in obstructive sleep apnea syndrome

Pathophysiological mechanisms underlying OSA are still elusive. Researchers endeavor to understand why patients with similar severity of OSA often have significantly different clinical manifestations and co-morbidities. Which mechanisms distinguish OSA in the pediatric and adult populations? How should the adequacy of treatment response be monitored? Studies on sleep deprivation in animal models [49–51] and OSA syndrome in human cohorts using proteomics approaches imply the great potential of this emerging discipline to impose scientific dilemmas of etiology, diagnosis, and treatment of OSA. Herein, we review the proteomics studies performed so far in children (Table 1) and adult (Table 2) populations, in an attempt to discover biomarkers for improving diagnosis, treatment, and a better understanding of OSA pathology.

Shih and Malhotra identified properties of an ideal biomarker for OSA, which should be highly sensitive, specific, dose-responsive, and correlate with the severity of the disease. The biomarker or set of biomarkers should serve as a measure of adequacy of therapy and be involved in the causal pathway, therefore being useful for predicting outcome [63,64].

The pioneering work of Shah et al. (2006) on serum proteome profiling in pediatric OSA patients is in concordance with criteria for an ideal OSA biomarker [52]. They identified three differently expressed proteins which could distinguish OSA versus OSA-free patients with 93% sensitivity and 90% of specificity [52] (Table 1). In this study the SELDI-TOF MS approach was used for analysis. After MS analysis, proprietary classification algorithms were applied, involving three nodes with distinct masses. Three discriminatory peaks of 5896, 3306, 6068 Da distinguished OSA from controls with 93% sensitivity and 90% specificity. A protein biomarker candidate corresponding to a peak at 5896 Da was identified as osteocalcin [52] (Table 1). Increased serum osteocalcin was previously observed in diseases with increased bone turnover and in children with growth retardation.

Since growth retardation is a frequent observation in children with OSA, authors suggested that the increase of osteocalcin in these patients may compensate for the growth deceleration imposed by the episodic asphyxic events associated with recurrent upper-airway obstruction [52].

Searching for a non-invasive biomarker test for OSA, Krishna et al. have used urine as a source for identifying new biomarkers [53]. They performed a study in a pediatric population with a mean age of 6.8 years. The discrimination criterion for stratification in the OSA/non-OSA group was AHI (AHI < 1/h – control; AHI > 5/h – OSA group). For proteomics analysis 2D-PAGE and the MALDI-TOF-TOF MS approach was used. After an image analysis of 22 urine samples, five spots were selected for further analysis based on intensity differences between two examined groups. Authors pinpointed five identified proteins ( $p < 0.05$ , protein score >67): gelsolin, percolan, albumin, tropomyosin, and immunoglobulin. Krishna and coauthors found a subset of proteins that markedly have different expression in the urine of pediatric patients with sleep-disordered breathing. Based on these results, the authors suggested the renal system as another end-organ target for OSA. Validation of these finding as well as future prospective studies on larger cohorts is required to confirm their findings [53]. Gozal et al. also conducted extensive 2D-DIGEs and MALDI-TOF-TOF MS studies of urinary proteome aiming to extend their preliminary findings in pediatric OSA [54]. The authors performed extensive 2D-DIGE experiments, 150 in total, to ascertain reproducibility and consistency of results. The total number of detectable protein spots ranged from 713 to 789 in all urine samples, of which 23 were markedly differently expressed across all gels.

About 12 novel non-redundant proteins were identified with a high level of confidence. Image analysis showed that three of the identified proteins were under-expressed while nine were overexpressed in OSA patients. Six of these 12 identified candidate biomarkers were validated by ELISA (Kallikrein, uromodulin, urocortin-3) and western blotting (tenascin, tribbles homolog-2, zinc finger protein 81). ROC analysis performed for uromodulin, urocortin-3, orosomucoid-1, and kallikrein shows high sensitivity and specificity in the identification of OSA. The authors suggested future larger prospective studies to validate the abovementioned findings.

Snow and collaborators used SELDI-TOF MS to profile proteins in the first morning void urines from children with OSA [55] and habitual snorers. Using the supervised linear discriminative analysis of the normalized peaks obtained from urine protein profiling, two distinct proteins among the OSA group were discovered, characterized by molecular weights of 4382 Da and 4640 Da. The most plausible and relevant preliminary identification of the putative biomarker pointed toward urocortin (UCN), which is the prototype of an important family – the corticotrophin-releasing hormone-related peptides which mediate response to stress as well as stress-coping processes. According to our knowledge, Kim and co-workers have been the first to analyze serum proteome of OSA adult subjects [56]. Criteria of OSA severity were based on AHI and correlated clinical symptoms. After 3–5 months on CPAP therapy, the serum of 10 subjects of

OSA and controls was subjected to proteomics analysis. Differently expressed proteins were

detected after previous separation of samples using silver-stained 2D-PAGE, followed by image analysis. Protein abundance per spot was elucidated by integrating pixel densities and correcting for the background. Spots which showed equal or higher than two-fold alteration in protein expression were considered for further MS analysis. In total, nine spots were found to be markedly up- or down-regulated in patients with OSA (Table 2). After excision, these protein spots were analyzed by MALDI-TOF-TOF MS, and identified using ProFound program. Except serum paraoxonase (PON1) and alpha-ferrous-carbonmonoxy, all identified proteins were highly abundant. These findings were validated by western blotting and ELISA techniques for the haptoglobin, PON1, and apo M [56]. It is important to note that levels of haptoglobin were significantly higher in all patients with OSA. However, after CPAP treatment the level of haptoglobin was markedly decreased. This finding implies haptoglobin as a putative serum biomarker for the follow up CPAP treatment in OSA patients. This behavior was not followed by the other two validated proteins. Haptoglobin and apo M were found to be independently associated with AHI [56].

Jurado Gámez et al., in 2010, applied sypro-ruby-stained 2D-PAGE for the analysis of serum protein signature of patients with different stages of OSA syndrome [57]. Patients were stratified by AHI into four groups – controls and mild, moderate, and severe OSA, each constituted by eight individuals. After image analysis, optical density of the protein spots which were three-fold changed compared to corresponding spots in control samples were considered as putative biomarkers. In total 10 protein spots met this criteria, of which three were overexpressed, while seven were under-expressed compared to controls. Although, none of these spots were further identified by MS, this preliminary work showed for the first time that distinct levels of a group of proteins can correlate with the severity of OSA. From this preliminary study, the authors moved on to apply a more powerful technique, iTRAQ isobaric tags associated with MALDI-TOF-TOF, aiming to obtain deeper knowledge and identify differently expressed proteins [58]. Researchers conducted a prospective observational study designed as described earlier [57]. To minimize any variance in findings, this study included only males referred to the Sleep Unit. Subjects were assigned into groups according to AHI: controls and mild, moderate, and severe OSA patients. Morning serum was collected and pooled according to OSA severity and control groups using equimolar protein contributions from each subject. Samples were prepared for proteomic analysis [58], labeled with iTRAQ4plex tagging kit, and analyzed by MALDI-TOF-TOF MS. Database searches (Protein Pilot) resulted in identification of 103 proteins of which 30 showed differences in expression between OSA and control groups (11 under- and 19 over-expressed) (Table 2). The authors highlighted that complement component 4-binding alpha and thrombospondin precursor proteins were significantly under-expressed in all OSA groups, while the rest of the underexpressed proteins were only assigned to the groups with mild and moderate OSA when compared to control. Among the overexpressed proteins it should be emphasized that fibronectin, Apo B100, immunoglobulin heavy constant alpha 1, and Apo D showed progressive severity-related ratio increases in OSA groups compared to control. Cellular fibronectin may be a protein marker for the activation of endothelial cells. Elevated ApoB-100 is associated with an increased risk of cardiovascular disease. Ceruloplasmin interacts with other proteins in the inflammatory pathways. Although, none of these proteins were verified by orthogonal techniques, the

authors suggested that these sets of modulated proteins can be potentially related to several metabolic pathways, such as the lipid and vascular metabolic pathways, suggesting that OSA may facilitate the onset and progression of atherogenesis. A number of proteins involved in coagulation, inflammation, and lipid metabolism may indeed interact in the context of OSA to affect lipid and vascular pathways. Jurado Gámez and collaborators concluded that protein expression correlates with severity of disease, but at the same time provides relevant mechanistic information.

Further, Jurado Gámez et al. designed a prospective pilot study aiming to identify differences in protein expression in patients with mild OSA syndrome [59]. Morning serum of individuals was acquired and processed for proteomic analysis. Peptide tryptic digests were labeled with isobaric tags (iTRAQ) and submitted to analysis by MALDI-TOF-TOF MS using ProteinPilot software for peptide identification. Proteins which had iTRAQ ratio >1.3 related to control, were considered as overexpressed and three proteins fulfilled this criterion: PRO0684, short immunoglobulin lambda VLJ, and kininogen HMW precursor. However, these results are preliminary and not validated by orthogonal techniques. Further study in a bigger cohort without gender discrimination is needed to confirm these findings.

Jurado-Gámez et al. designed another prospective study using 2-PAGE to identify differentially expressed proteins in an OSA population with an age range between 30 and 70 years [60]. They identified haptoglobin as overexpressed in OSA. Haptoglobin has been associated with cardiovascular risk in patients with OSA [65]. Two under-expressed spots were identified as albumin and serotransferrin, suggesting that these proteins can facilitate a decrease of the antioxidant defenses in OSA. Albumin is the most abundant protein in the circulatory system. Low abundance of serum albumin can be related with high levels of urinary albumin excretion observed in OSA patients, even in the absence of associated hypertension or diabetes [66]. Albumin has an antioxidative activity due to its capacity to bind ions and to eliminate free radicals [67]. Serotransferrin is a glycoprotein produced and metabolized in hepatocytes and the main function is iron transport in blood allowing an antioxidant capacity [60]. Shinohara and co-workers examined plasma proteomic profiling in severe OSA patients with obesity ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ) and non-OSA patients without obesity ( $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ) [61]. In this work, the shotgun approach was used in protein analysis. A total of 19,745 components were tracked and differentially quantified. Many proteins regarding inflammation and immune response, including complement proteins, two acute-phase reactants ceruloplasmin and serum amyloid P-component, were found to be highly expressed in obese severe OSA patients (Table 2). The authors concluded that protein changes responsible for immune modulation and inflammation may be a feature of OSA patients. The authors acknowledged limitations of the study due to small sample size. However, they highlighted findings of the study, which revealed that a high percentage of differently expressed proteins are associated with modulation of immune system and inflammation, thus suggesting that these mechanisms are involved in OSA syndrome. Further verification and validation of these findings will be necessary to confirm their participation in the pathophysiology of OSA.



During revision of this manuscript we came across the work of Seetho et al. reporting urinary proteomics profiling in OSA and non-OSA obese adult patients using CE-MS technology [62]. The data showed 24 peptides that were differentially abundant ( $p < 0.01$ ) between patient groups, although these differences did not reach significance after adjustment for multiple statistical testing to account for false positives (false discovery rate). Some of these peptides originated from collagens and fibrinogen alpha. No further verification experiments were performed.

## 4. Conclusion

Heterogeneous studies in sampling, relatively small cohorts, nonstandardized diagnostic methods, lack of verification and validation data are the main drawback of proteomics studies made to date in OSA patients. At this stage, these studies should be considered very preliminary. Nevertheless, the results obtained so far are tremendously encouraging for showing significant differences in OSA proteome profile which, once validated, may be considered for translation into a proteomics-based noninvasive testing for OSA screening, diagnosis, or prognosis. These first studies opened new perspectives for future proteomic evaluation in OSA patients, orienting the design of future proteomics studies. Those should be undertaken as much as possible in bigger cohorts of adults/children with OSA presenting different levels of severity and co-morbidities. Proteomics analysis in different biological samples (other than serum or urine), such as plasma, blood cells (eg, red blood cells, macrophages) or even nasal epithelia, should also be considered in future studies. In terms of proteomic technology, the application of complementary approaches such as 2D-DIGE with higher-throughput technologies such as LC-MS/MS using a new generation of mass spectrometers (eg, orbitrap system) and/or a target proteomics approach (SRM assay) will certainly increase markedly the sensitivity/specificity for biomarker identification in OSA. A verification step using orthogonal technologies should always be considered as a crucial step to better select the most promising candidates for further clinical trial validation. Since OSA is a disorder occurring during sleep time, evaluating proteomic signature before, during, and after sleep in persons with and without CPAP therapy could give an answer regarding molecular pathways and metabolic alterations in persons with OSA. Such changes will be at least partly a consequence of chronic intermittent hypoxia and sleep fragmentation that occur during the sleep.

In summary, much investigation remains to be done before we can define potential biomarkers for OSA with impact on diagnosis, disease management, and prognosis of this prevalent disorder. Research efforts could then be directed at identifying novel treatment interventions that not only modify the biomarker levels but also affect the pathophysiology of the disease and its clinical outcome.

## Acknowledgments

Work partially supported by Harvard Medical School – Portugal Program (HMSP-ICJ/0022/2011), Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)/Poly-Annual Funding Program and FEDER/Saúde XXI Program (Portugal) and postdoctoral FCT-fellowship (SFRH/BPD/43365/2008).

## References

1. Yim, S.; Jordan, A.; Malhotra, A. Obstructive sleep apnea: clinical presentation, diagnosis and treatment. In: Randerath, WJ.; Sanner, BM.; Somers, VK., editors. Sleep apnea current diagnosis and treatment. Basel: Karger; 2006. p. 118-36.
2. Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med.* 2005; 142:187–97. [PubMed: 15684207]
3. Pack AI. Advances in sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:7–15. [PubMed: 16284108]
4. McNicholas WT, Bonsignore MR. Management Committee of ECAB. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *Eur Respir J.* 2007; 29:156–78. [PubMed: 17197482]
5. Lurie A. Obstructive sleep apnea in adults: epidemiology, clinical presentation, and treatment options. *Adv Cardiol.* 2011; 46:1–42. [PubMed: 22005188]
6. Lumeng JC, Chervin RD. Epidemiology of pediatric obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5:242–52. [PubMed: 18250218]
7. Attal P, Chanson P. Endocrine aspects of obstructive sleep apnea. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:483–95. [PubMed: 20061419]
8. Lin QC, Zhang XB, Chen GP, Huang DY, Din HB, Tang AZ. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome in nonobese adults. *Sleep Breath.* 2012; 16:571–8. [PubMed: 21681412]
9. Schmid SM, Hallschmid M, Schultes B. The metabolic burden of sleep loss. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 3:52–62. [PubMed: 24731536]
10. Coughlin SR, Mawdsley L, Mugarza JA, Calverley PM, Wilding JP. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J.* 2004; 25:735–41. [PubMed: 15120883]
11. Madani M, Madani F. Epidemiology, pathophysiology, and clinical features of obstructive sleep apnea. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2009; 21:369–75. [PubMed: 19944337]
12. Health Quality Ontario. Polysomnography in patients with obstructive sleep apnea: an evidencebased analysis. *Ont Health Technol Assess Series.* 2006; 6:1–38.
13. Whittle AT, Finch SP, Mortimore IL, MacKay TW, Douglas NJ. Use of home sleep studies for diagnosis of the sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Thorax.* 1997; 52:1068–73. [PubMed: 9516901]
14. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the sleep apnea definitions task force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med.* 2012; 8:597–619. [PubMed: 23066376]
15. Bahammam AS, Obeidat A, Barataman K, Bahammam SA, Olaish AH, Sharif MM. A comparison between the AASM 2012 and 2007 definitions for detecting hypopnea. *Sleep Breath.* 2014; 18:767–73. [PubMed: 24493077]
16. Guilleminault C, Hagen CC, Huynh NT. Comparison of hypopnea definitions in lean patients with known obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS). *Sleep Breath.* 2009; 13:341–7. [PubMed: 19418083]
17. Knapp A, Myhill PC, Davis WA, et al. Effect of continuous positive airway pressure therapy on sexual function and serum testosterone in males with type 2 diabetes and obstructive sleep apnoea. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014; 81:254–8. [PubMed: 24392703]
18. Sanchez AI, Martinez P, Miro E, Bardwell WA, Buela-Casal G. CPAP and behavioral therapies in patients with obstructive sleep apnea: effects on daytime sleepiness, mood, and cognitive function. *Sleep Med Rev.* 2009; 13:223–33. [PubMed: 19201228]
19. Ballard RD. Management of patients with obstructive sleep apnea. *J Fam Pract.* 2008; 57:S24–30. [PubMed: 18687236]
20. Stasche N. Selective indication for positive airway pressure (PAP) in sleep-related breathing disorders with obstruction. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 5:Doc06. [PubMed: 22073075]

*Sleep Med.* Author manuscript; available in PMC 2015 October 01.

21. Tan HL, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. The promise of translational and personalised approaches for paediatric obstructive sleep apnoea: an 'Omics' perspective. *Thorax*. 2014; 69:474–80. [PubMed: 24550060]
22. Smith LM, Kelleher NL. Consortium for Top Down P. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods*. 2013; 10:186–7. [PubMed: 23443629]
23. Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol*. 2000; 11:408–12. [PubMed: 10975462]
24. Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, Ping P. Proteomics-based development of biomarkers in cardiovascular disease: mechanistic, clinical, and therapeutic insights. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5:1853–64. [PubMed: 16733263]
25. Simões, T.; Charro, N.; Alexandre, BM.; Penque, D. *J Allergy Ther*. Vol. S7. OMICS Group; 2012. Proteomics in detection and monitoring chronic lung diseases: the human nasal epithelium as a molecular model; p. 004
26. O'Neil SE, Palviainen MJ, Ten Have S, et al. Clinical proteomics stretch goals: EuPA 2012 roundtable report. *J Proteomics*. 2013; 88:37–40. [PubMed: 23597926]
27. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1:845–67. [PubMed: 12488461]
28. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR. 3rd Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013; 113:2343–94. [PubMed: 23438204]
29. Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997; 18:2071–7. [PubMed: 9420172]
30. Penque D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *PROTEOMICS Clin Appl*. 2009; 3:155–72.
31. Megger DA, Bracht T, Meyer HE, Sitek B. Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1834:1581–90. [PubMed: 23567906]
32. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. 3rd A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2004; 76:4193–201. [PubMed: 15253663]
33. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, iCAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res*. 2006; 5:651–8. [PubMed: 16512681]
34. Peng J, Stanley AJ, Cairns D, Selby PJ, Banks RE. Using the protein chip interface with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to directly identify peaks in SELDI profiles—initial evaluation using low molecular weight serum peaks. *Proteomics*. 2009; 9:492–8. [PubMed: 19142938]
35. Mischak H, Coon JJ, Novak J, Weissinger EM, Schanstra JP, Dominiczak AF. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments. *Mass Spectrom Rev*. 2009; 28:703–24. [PubMed: 18973238]
36. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5:573–88. [PubMed: 16332733]
37. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods*. 2012; 9:555–66. [PubMed: 22669653]
38. Liebler DC, Zimmerman LJ. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*. 2013; 52:3797–806. [PubMed: 23517332]
39. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 2006; 24:971–83. [PubMed: 16900146]
40. Paulovich AG, Whiteaker JR, Hoofnagle AN, Wang P. The interface between biomarker discovery and clinical validation: the tar pit of the protein biomarker pipeline. *PROTEOMICS Clin Appl*. 2008; 2:1386–402. [PubMed: 20976028]
41. Skates SJ, Gillette MA, LaBaer J, et al. Statistical design for biospecimen cohort size in proteomics-based biomarker discovery and verification studies. *J Proteome Res*. 2013; 12:5383–94. [PubMed: 24063748]
42. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003; 422:198–207. [PubMed: 12634793]

43. Matthiesen R, Bunkenborg J. Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol.* 2013; 1007:1–45. [PubMed: 23666720]
44. Matthiesen R, Prieto G, Amorim A, et al. SIR: deterministic protein inference from peptides assigned to MS data. *J Proteomics.* 2012; 75:4176–83. [PubMed: 22626983]
45. Matthiesen R, Azevedo L, Amorim A, Carvalho AS. Discussion on common data analysis strategies used in MS-based proteomics. *Proteomics.* 2011; 11:604–19. [PubMed: 21241018]
46. Carvalho AS, Ribeiro H, Voabil P, et al. Global mass spectrometry and transcriptomics array based drug profiling provides novel insight into glucosamine induced ER stress. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13:3294–307. [PubMed: 25128556]
47. Matthiesen R, Carvalho AS. Methods and algorithms for quantitative proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2013; 1007:183–217. [PubMed: 23666727]
48. Matthiesen R. Algorithms for database-dependent search of MS/MS data. *Methods Mol Biol.* 2013; 1007:119–38. [PubMed: 23666724]
49. Row BW, Goldbart A, Gozal E, Gozal D. Spatial pre-training attenuates hippocampal impairments in rats exposed to intermittent hypoxia. *Neurosci Lett.* 2003; 339:67–71. [PubMed: 12618302]
50. Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:1548–53. [PubMed: 12615622]
51. Basheer R, Brown R, Ramesh V, Begum S, McCarley RW. Sleep deprivation-induced protein changes in basal forebrain: implications for synaptic plasticity. *J Neurosci Res.* 2005; 82:650–8. [PubMed: 16273548]
52. Shah ZA, Jortani SA, Tauman R, Valdes R Jr, Gozal D. Serum proteomic patterns associated with sleep-disordered breathing in children. *Pediatr Res.* 2006; 59:466–70. [PubMed: 16492991]
53. Krishna J, Shah ZA, Merchant M, Klein JB, Gozal D. Urinary protein expression patterns in children with sleep-disordered breathing: preliminary findings. *Sleep Med.* 2006; 7:221–7. [PubMed: 16564219]
54. Gozal D, Jortani S, Snow AB, et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis proteomic approaches reveal urine candidate biomarkers in pediatric obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180:1253–61. [PubMed: 19797158]
55. Snow A, Gozal D, Valdes R Jr, Jortani SA. Urinary proteins for the diagnosis of obstructive sleep apnea syndrome. *Methods Mol Biol.* 2010; 641:223–41. [PubMed: 20407950]
56. Kim J, Lee S, In K, et al. Increase in serum haptoglobin and apolipoprotein M in patients with obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res.* 2009; 18:313–20. [PubMed: 19566894]
57. Jurado Gámez B, Gómez-Chaparro Moreno JL, Muñoz Calero M, et al. Variación de la expresión proteica en función de la gravedad del síndrome de apnea-hipopnea del sueño. *Arch Bronconeumol.* 2010; 46:288–93. [PubMed: 20181421]
58. Jurado-Gamez B, Gomez-Chaparro JL, Munoz-Calero M, et al. Serum proteomic changes in adults with obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res.* 2012; 21:139–46. [PubMed: 21923731]
59. Jurado Gámez B, Muñoz Calero M, García Porcuna I, et al. Valoración de la sobreexpresión proteica en pacientes con SAHS leve. *Rev Esp Patol Torác.* 2012; 24:178–83.
60. Jurado Gámez B, Arenas Delarriva MS, Muñoz Calero M, et al. Papel de la proteómica en la identificación de proteínas diferenciales en pacientes con sahs. *Rev Esp Patol Torác* 2012; 24:272–8.
61. Shinohara M, Sakurai T, Sakao S, et al. Plasma proteomic analysis in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Biolog Rhythms.* 2012; 10:336–9.
62. Seetho IW, Siwy J, Albalat A, et al. Urinary proteomics in obstructive sleep apnoea and obesity. *Eur J Clin Invest.* 2014; 44:1104–15. [PubMed: 25267120]
63. Shih JL, Malhotra A. Could vitamins be helpful to patients with sleep apnea? *Chest.* 2011; 139:237–8. [PubMed: 21285049]
64. Montesi SB, Bajwa EK, Malhotra A. Biomarkers of sleep apnea. *Chest.* 2012; 142:239–45. [PubMed: 22796846]

65. Lavie L, Lotan R, Hochberg I, Herer P, Lavie P, Levy AP. Haptoglobin polymorphism is a risk factor for cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*. 2003; 26:592–5. [PubMed: 12938813]
66. Ursavas A, Karadag M, Gullulu M, et al. Low-grade urinary albumin excretion in normotensive/non-diabetic obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath*. 2008; 12:217–22. [PubMed: 18335264]
67. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001; 3:293–311. [PubMed: 11396483]



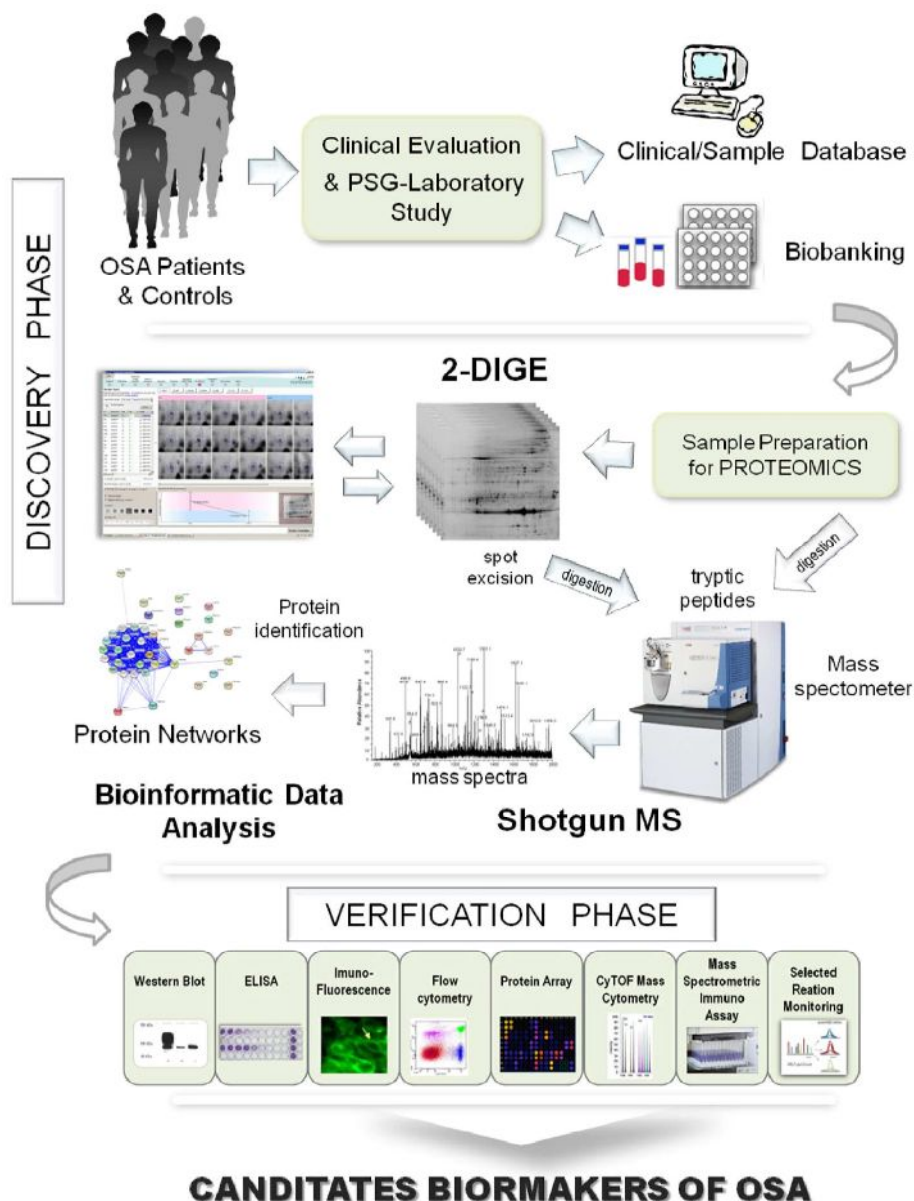
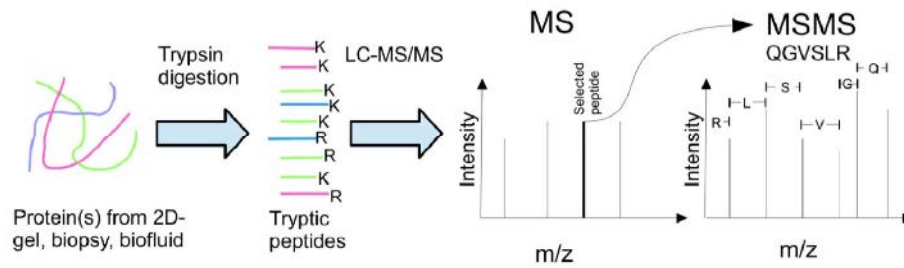


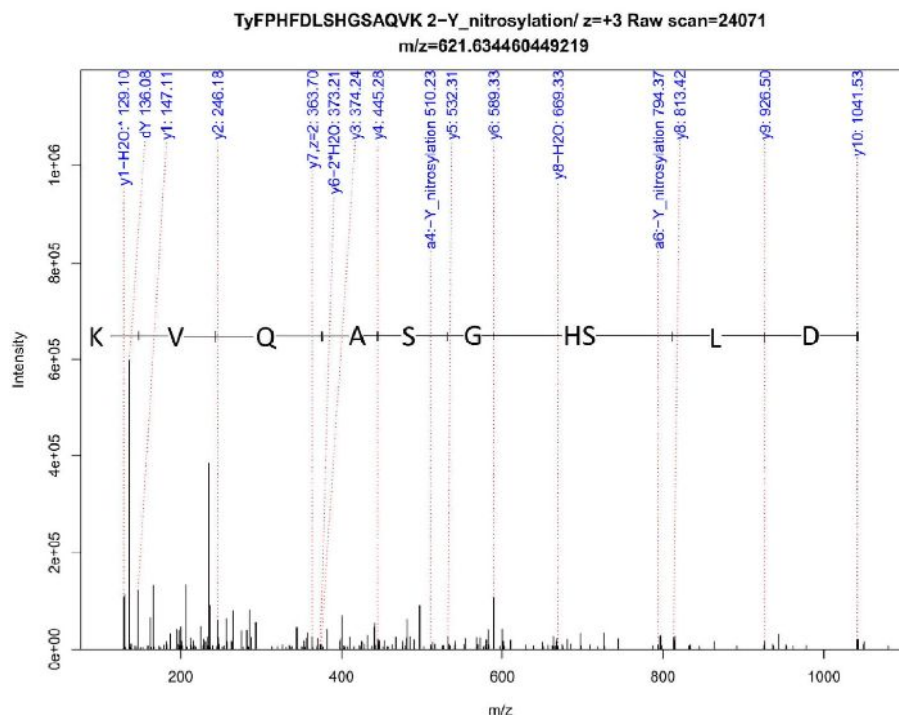
Fig. 1.

Discovery-based strategy for candidate biomarker of Obstructive Sleep Apnea. In discoverybased proteomics approach, the 2D-difference gel electrophoresis (2-DIGE) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) (Shotgun) are the most popular methodologies to identify disease candidate biomarkers. The proteins identified as differentially abundant (up/down and present/absent) in disease are verified by orthogonal methodologies (other than those used in the discovery phase) before proceeding to the next validation phase in a larger cohort of patients and translation into clinical application.



**Fig. 2.**

Simplified scheme of a typical mass spectrometry (MS)-based strategy to identify potential biomarkers (bottom up proteomics). In the first step proteins (A) are digested (B) to peptides (C) usually by trypsin (which predominantly cleaves at the carboxyl side of lysine “K” and arginine “R” except when either is followed by proline). (D) The tryptic peptides generated from protein digestion are injected into a liquid chromatography system (for peptide separation) online coupled with a mass spectrometer, which employs two stages of mass analysis (tandem MS, MS/MS). (E) The first stage is MS which corresponds to mass scans of peptides eluted at different time points from the LC system. (F) In the second stage, some peptides, usually the most abundant, are automatically selected for fragmentation generating MS/MS spectra. Mass differences between peaks in the MS/MS spectrum can be directly correlated to amino acid residues and a short peptide sequence can be obtained. Protein and peptide identification is achieved by computer-based matching of the experimental tandem mass spectra with the theoretical tandem mass spectra generated from *in silico* digestion of protein sequence databases.

**Fig. 3.**

Annotated raw tandem mass spectrometry (MS/MS) spectrum (real example of Fig. 2F) of the peptide “TyFPHFDSLHGSAQVK nitrosylation” from hemoglobin subunit alpha with tyrosine nitrosylated. Protein extracts of OSA erythrocyte cells were digested by trypsin followed by liquid chromatography (LC)–MS/MS analysis. The peptide

“TyFPHFDSLHGSAQVK nitrosylation” was observed at charge state  $z \geq +3$  in scan number 24071 (which corresponded to a specific elution time from the LC system) and at 621.6344 m/z. The x-axis is mass over charge (m/z) for fragment ions and the y-axis is intensity counts. Theoretical fragment ions that match the observed fragments in the MS/MS spectrum are annotated with blue text. Amino acid residues can be correlated to mass difference between peaks. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Table 1

Proteomics studies conducted in children with obstructive sleep apnea (OSA).

Reference	Proteomics approach	Sample	Main findings	Orthogonal verification
Shah et al. [52]	SELDI-TOF	Children/urine (20 OSA/20 controls)	↑3 protein peaks (5896, 3306, 6068 Da) with 93% sensitivity/90% specificity Peak 5896 Da identified as osteocalcin	No
Krishna et al. [53]	2D-PAGE/MALDI/TOF/TOF	Children/urine (11 OSA/11 controls)	↑Gelsolin, perlecan, albumin, tropomyosin and immunoglobulin	No
Gozal et al. [54]	2D-DIGE	Children/urine (60 OSA/60 controls)	12 proteins identified modulated ↑Uromodulin, urocortin-3, cerotomucoid-1 and ↓kallikrein with high sensitivity/specificity in ROC analysis	ELISA ↑kallikrein, uromodulin and urocortin-3 WB ↑tenascin, wibbles homolog-2 and ↓zinc finger protein 81)
Snow et al. [55]	SELDI-TOF	Children/urine (30 OSA/25 controls)	↑Urocortins	No

2D-DIGE, two-dimensional difference gel electrophoresis; 2D-PAGE, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; SELDI, surface enhanced laser desorption ionization; TOF, time of flight.

Table 2

Proteomics studies conducted in adults with obstructive sleep apnea (OSA).

Reference	Proteomics approach	Sample	Main findings	Orthogonal verification
Kim et al. [56]	2D-PAGE (silver staining)/MALDI/TOF/TOF	Adults/serum depleted for albumin and IgG (40 OSA/34 controls)	↑Haptoglobin, apolipoprotein M (apoM) and four complement components, ↓paraoxonase-1 (PNO1) and α-ferrous-carboxymoxy	WB (↑haptoglobin, apoN and ↓PNO1) haptoglobin decreased after CPAP
Jurado Gómez et al. [57]	2D-PAGE (sypro-ruby staining)	Adults/serum depleted by Proteominer kit (24 OSA/8 controls)	10 spot proteins modulated (3 ↑ and 7 ↓) No MS identification	No
Jurado Gómez et al. [58]	iTRAQ/MALDI/TOF/TOF	Adults/sera (30 OSA mild/moderate/severe/10 controls)	30 proteins identified modulated (19 ↑ and 11 ↓) ↓C4BPalpha and thrombospondin in all three OSA groups; ↓ vitronectin clusters isoform2, ApoE and antithrombin in mild and moderate OSA 13 ↑ in mild, 7 ↑ in moderate and 5 ↑ in severe OSA. Alterations in lipidic and vascular and metabolic pathways are particularly involved	No
Jurado Gómez et al. [59]	iTRAQ/MALDI/TOF/TOF	Adults/sera (11 OSA/11 controls)	↑PR00684, short immunoglobulin lambda VLJ and kininogen HMW precursor involved in inflammation, immune response and coagulation	No
Jurado Gómez B et al. [60]	2D-PAGE (sypro-ruby staining)/MALDI/TOF/TOF	Adults/sera (37 OSA/18 controls)	↑Haptoglobin ↓Albumin and serotransferrin	No
Shinohara et al. [61]	LC/MS/MS (LTQ instrument)	Adults/plasma (6 severe obese OSA/6 controls non-obese)	26 proteins modulated (12 ↑ and 14 ↓) ↑Complement proteins, ceruloplasmin, amyloid P-component associated with inflammation and immunomodulation	No
Seetho et al. [62]	CE-MS	Adults/urine (61 obese OSA/31 obese non-OSA)	24 peptides (some of these generated from collagens and fibrinogen alpha) were candidates for differential distribution	No

CE, capillary electrophoresis; 2D-PAGE, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; LC, liquid chromatography; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MS, mass spectrometry; TOF, time of flight.

Surpreendentemente, o potencial da proteômica na investigação clínica da SAOS tem sido pouco explorado, sendo que a primeira abordagem foi feita ao nível do rastreio diagnóstico. Alguns estudos de proteômica deram os primeiros passos em crianças, havendo menor número de estudos envolvendo adultos. Os resultados preliminares desses estudos são promissores, uma vez que apontam para a existência de uma expressão proteica na SAOS que difere dos controlos, geralmente roncadores, mas ainda sem a identificação de biomarcadores da doença ou de resposta ao tratamento.

Relativamente às técnicas de análise proteómica, a electroforese bidimensional (*2-Dimensional Electrophoresis* - 2DE), que consiste na separação de misturas complexas de proteínas de acordo com as suas propriedades físico-químicas, é considerada a abordagem preferencial na separação e identificação de proteínas no sangue (principalmente plasma e glóbulos vermelhos). Na última década, a abordagem proteómica por *shotgun* tornou-se na abordagem de eleição para a identificação de proteínas em estudos de larga escala, apresentando maior sensibilidade que a 2DE. Esta abordagem tem como base a digestão trípica de proteínas, conduzindo a uma mistura complexa de péptidos que são separados através de uma ou múltiplas dimensões cromatográficas. A sequenciação peptídica é realizada através de um espectómetro de massa e, posteriormente, procedendo-se à pesquisa automática das respetivas proteínas numa base de dados. A possibilidade de combinar estas duas técnicas permite uma abordagem complementar cujos resultados podem ser promissores.

Após a submissão e aceitação deste artigo de revisão para publicação, há a referir uma revisão sistemática da literatura, recentemente publicada [279], que englobou 30 estudos que incidiram na procura de biomarcadores nos doentes com SAOS, usando cromatografia e/ou espectrometria de massa. Esta revisão demonstrou que numerosas proteínas e metabolitos, incluindo perfis lipídicos, biomarcadores adrenérgicos/dopaminérgicos, amino ácidos, biomarcadores de *stress* oxidativo e outras micromoléculas, foram identificadas nos doentes com SAOS. A maioria dos estudos mencionados foram também referidos no seu artigo de revisão, tendo ainda sido mencionados dois estudos adicionais [280, 281]. O estudo de Becker L *et al.* [280] incidiu sobre o proteoma urinário de 14 crianças com SAOS comparativamente a 13 controlos, concluindo que o género e fatores diurnos são responsáveis pela importante variabilidade do proteoma urinário. O estudo de Zheng H *et al.* [281] incidiu sobre a saliva de 20 doentes com SAOS e sem patologia cardiovascular em comparação com 18 doentes com SAOS mas portadores dessa patologia. Este estudo demonstrou a existência de uma expressão diferencial da cadeia  $\alpha$  do fibrinogénio, da glicoproteína HS  $\alpha$ -2 e da cadeia  $\alpha$ -4A da tubulina. Refere-se, ainda, um artigo recente de Seetho IW *et al.* [282] que avaliou o proteoma urinário através da electroforese capilar associada a espectrometria de massa. Neste estudo, 27

adultos obesos com SAOS sob 15 meses de tratamento com PAP foram comparados com 25 controlos (obesos sem SAOS), reportando uma expressão diferencial de 15 péptidos entre estes dois grupos, a maioria péptidos de colagénio  $\alpha$ -1, cadeia do fibrinogénio e T-caderina. No entanto, o teste múltiplo não atingiu significado estatístico.

Um dos desafios da análise de biomarcadores é a seleção e colheita apropriada de espécies biológicas, uma vez que existe uma vasta gama de materiais biológicos que podem ser usados. A investigação do proteoma urinário nos doentes com SAOS tem sido atrativa para alguns investigadores. Por um lado, face à simplicidade da colheita deste meio biológico, particularmente importante nas crianças. Por outro, pelo facto dos rins serem sensíveis à hipóxia intermitente que ocorre na SAOS, o que poderá refletir-se no proteoma urinário. No entanto, a variância intrínseca do proteoma da urina limita o seu poder discriminativo e dificulta a deteção de biomarcadores no contexto da SAOS [280]. Assim, estes fatores associados aos problemas de reprodutibilidade e padronização dos protocolos proteómicos instigaram a procura de biomarcadores noutros fluídos biológicos. Pelo facto do sangue perfundir todos os tecidos do organismo, têm sido usados progressivamente os seus constituintes (soro, plasma e glóbulos vermelhos) na avaliação do perfil proteico em determinadas doenças. Sendo a SAOS uma doença sistémica, o sangue ou os seus constituintes, sobretudo plasma e glóbulos vermelhos, parecem ser um bom meio biológico para essa abordagem. Em particular, os glóbulos vermelhos (GV) têm ganho especial interesse nos estudos proteómicos, uma vez que são fundamentais para as trocas gasosas e no combate ao *stress* oxidativo.

### **A importância dos glóbulos vermelhos**

Os glóbulos vermelhos constituem 99% das células sanguíneas e estão envolvidos em numerosos processos, devido ao fácil relacionamento com outras células. A principal função dos GV é mediar o transporte do oxigénio/dióxido de carbono entre as células/tecidos e os pulmões, e esta função é possível em consequência da morfologia e deformabilidade da membrana, permitindo a circulação nos vasos e capilares. Os GV, também, foram reportados como atuando como biossensores de *stress* oxidativo, por exemplo na doença pulmonar obstrutiva crónica [283].

Nos humanos, os GV maduros circulantes são a etapa final de um processo de desenvolvimento que começa na medula óssea, como células estaminais hematopoiéticas, as quais por sua vez se diferenciam em GV nucleados. Após a saída do núcleo e a degradação do retículo endoplasmático, os reticulócitos emergem em circulação onde rapidamente se desenvolvem em GV maduros, apresentando estes 4 meses de sobrevida. Os GV maduros consistem num citoplasma delimitado por

uma membrana plasmática, carecendo de estruturas celulares internas, como o núcleo, os organelos e o equipamento para a síntese proteica, e são, portanto, incapazes de sintetizarem novas proteínas em substituição daquelas que são danificadas no decurso da sua sobrevida. Por este facto, considerava-se que o proteoma do GV seria relativamente simples. No entanto, nos últimos anos foi possível um melhor conhecimento deste proteoma, o que fez mudar drasticamente estes pressupostos (por exemplo nos estudos de [284, 285]). Um estudo recente acerca do proteoma dos GV aponta para a existência de 2,289 proteínas únicas [286], organizadas em dois grupos principais, as proteínas esqueléticas da membrana e as enzimas metabólicas citosólicas. A maioria das proteínas identificadas como proteínas solúveis está implicada no metabolismo celular ou no transporte celular, sendo a hemoglobina o principal constituinte citoplasmático. A maioria das proteínas envolvidas no processo metabólico participa em processos catabólicos ou está envolvida no metabolismo das macromoléculas.

### Os glóbulos vermelhos e o *stress* oxidativo

Durante o seu período de vida, os GV viajam pelo organismo e contatam com diferentes metabolitos, células e tecidos, traduzindo-se na possibilidade de acumular modificações nas suas proteínas. Por esse motivo, podem indiretamente “reportar” as alterações decorrentes de determinada doença [287]. Por outro lado, os GV, de forma continuada, estão expostos a ciclos de normóxia/hipóxia e a fontes endógenas e exógenas de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, uma vez que têm a capacidade de captar oxidantes a partir da circulação (Figura 5). Por esta razão, os GV são considerados os principais efetores do sistema antioxidante intravascular [288]. Com efeito, um estudo recente que analisou as vias onde participam as proteínas eritrocitárias veio reforçar que os GV sofrem frequentes exacerbações de *stress* oxidativo e estão numa luta contínua contra o dano proteico e do citoesqueleto [285]. Já é antiga a noção de que, pelo facto dos GV maduros não apresentarem núcleo nem alguns organelos, como a mitocôndria, a principal fonte de ROS endógenas não é a fosforilação oxidativa a partir da cadeia respiratória, mas sim a auto-oxidação da hemoglobina [289]. A hemoglobina é a proteína mais abundante dos GV e a manutenção da sua estabilidade é fundamental para a fisiologia normal dos GV. Apesar disso, os GV estão expostos a um fluxo constante de auto-oxidação da hemoglobina, em que em cada 24 horas cerca de 3% sofre oxidação. Adicionalmente, estudos recentes indicam que os GV contêm oxidases NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), que podem também gerar ROS endógenas [290].

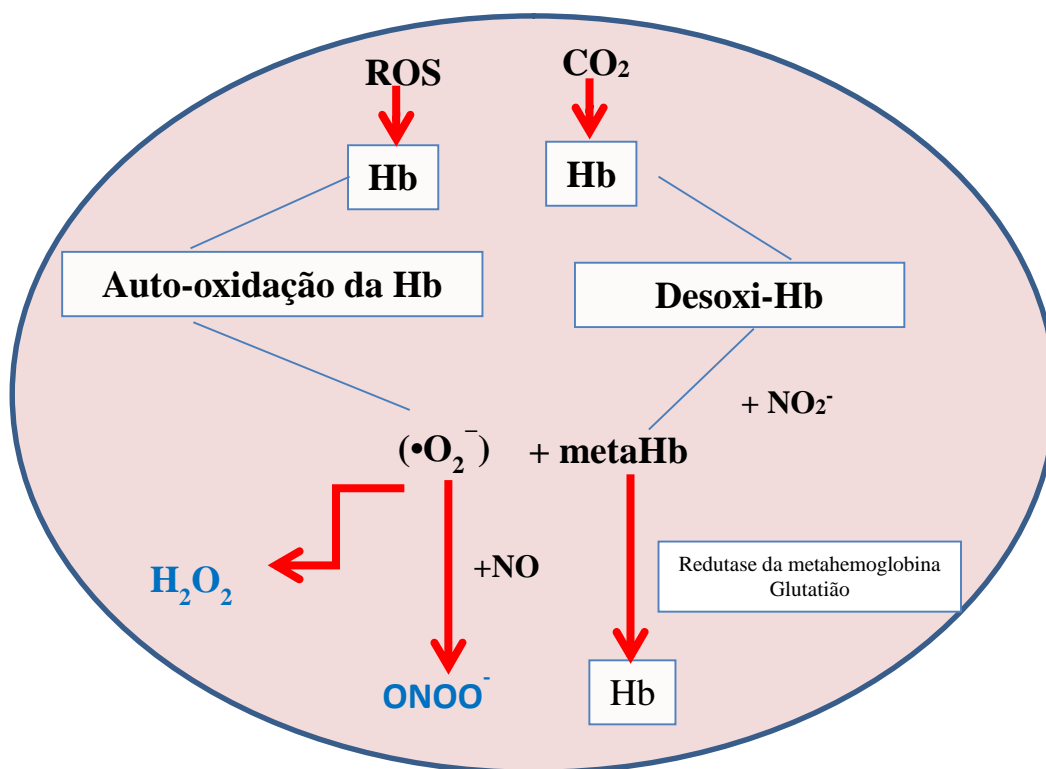
Nos GV as ROS são neutralizadas por um extenso sistema anti-oxidante, o qual inclui anti-oxidantes não enzimáticos (ácido ascórbico e glutatião) e antioxidantes enzimáticos (superóxido

dismutase, catalase [291], peroxidase do glutatião [292], peroxirredoxina-2 [293], redutase da metahemoglobina e desidrogenase da glucose 6-fosfacto). Não obstante, a capacidade do sistema antioxidante para neutralizar as ROS está limitada à medida em que o sangue circula na microcirculação e a hemoglobina se torna parcialmente oxigenada [294]. Por sua vez, as ROS que não são neutralizadas no GV podem levar à lesão membranar [295]. Esse dano pode comprometer o fluxo dos GV ao nível da micro-circulação e a entrega do oxigênio às células, resultando na lesão dos tecidos e inflamação [296], desencadeando eventualmente a sua remoção da circulação pelo sistema reticulo-endotelial (células fagocitárias mononucleares primariamente do baço, mas também do fígado e dos gânglios). O dano das proteínas membranares é, por sua vez, responsável pelo compromisso da deformabilidade celular associada ao *stress* oxidativo [297]. Adicionalmente, já é reconhecido há vários anos que uma das ROS (peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$ ) que não é neutralizada pelo sistema anti-oxidante do GV pode reagir com o heme produzindo produtos de degradação do heme [298], os quais são considerados como marcadores de *stress* oxidativo do GV.

A remodelação crônica vascular que ocorre na aterosclerose oclusiva envolve a presença de GV, leucócitos, plaquetas e fibrina. O grupo heme dos GV, que atua como catalisador da reação oxidante dos leucócitos, é provavelmente a fonte principal de *stress* oxidativo capaz de modificar os lípidos e as proteínas, levando à progressão da remodelação crônica vascular [299]. Este dado é importante, uma vez que a aterosclerose está subjacente às complicações da SAOS.

### **Importância do peróxido de hidrogênio**

Tem sido acumulada evidência no sentido do  $H_2O_2$  ser quer uma molécula importante de sinalização [300] participante no desenvolvimento celular normal, quer um indicador de *stress* oxidativo. Mas a sinalização pelo  $H_2O_2$  em situações de não-*stress* é ainda controversa. Em contrapartida, as vias de sinalização do  $H_2O_2$  relacionadas com o *stress* compreendem uma resposta que consiste na ativação de antioxidantes protetores e no aumento da transcrição de proteínas de reparação. Nesse sentido, os mamíferos apresentam um conjunto de peroxidases que têm como função reduzir o  $H_2O_2$  a água, e que são a catalase, a peroxidase do glutatião e as perorredoxinas (PRDX).



**Figura 5:** Formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no glóbulo vermelho.

Através da auto-oxidação da hemoglobina é formado metahemoglobina, a qual já não pode transportar oxigênio, e superóxido, o qual rapidamente é catalisado para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Complementarmente, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) formado pelo metabolismo aeróbio dos nutrientes liga-se à hemoglobina e causa a sua desoxigenação [301]. A desoxihemoglobina reage com o nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) que está em circulação e forma a metahemoglobina com libertação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e óxido nítrico (NO) [302]. Por sua vez, ocorre formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) como produto do metabolismo do NO na presença de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [303]. De seguida, a metahemoglobina formada é reduzida a hemoglobina pela redutase NADPH da metahemoglobina (redutase do citocromo-b5), sistemas do ácido ascórbico e do glutatião [304].  
 Legenda: ROS: espécies reativas de oxigênio; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; Hb: hemoglobina; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito,  $\bullet\text{O}_2^-$ : anião superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NO: óxido nítrico; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito.

Apesar das recentes tecnologias proteômicas serem uma ferramenta fundamental na pesquisa de novos mediadores, até ao momento existem poucos estudos na SAOS usando a proteômica e nenhum usando os GV como meio biológico. Efetivamente, nos adultos com SAOS ainda não foi investigado o seu “perfil” proteômico eritrocitário, se esse “perfil” depende da gravidade da doença e se sofre alterações após o tratamento com PAP. Uma vez que a hipóxia e o *stress* oxidativo são processos que estão na base da SAOS e das suas consequências, seria promissor o estudo proteômico nos GV nos doentes com SAOS e, em particular, avaliar a expressão dos anti-oxidantes, bem como a sua modulação após tratamento com PAP.

## *CAPÍTULO* 2



---

## OBJETIVOS

Nesta tese definiu-se como **objetivo geral** investigar, em doentes com SAOS, a existência de biomarcadores de gravidade e de resposta à terapêutica, através da pesquisa direcionada (convencional) e da pesquisa exploratória (proteómica).

Fixaram-se como **objetivos específicos** avaliar o comportamento de biomarcadores de inflamação, metabólicos e de *stress* oxidativo. Em concreto, pela via convencional pretendeu-se avaliar o comportamento da homocisteína, dos parâmetros glicídicos, lipídicos e do hemograma, e pela via exploratória (proteómica) as proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas e pertencentes às vias de *stress* oxidativo.

De acordo com os objetivos formulados, projetou-se a realização de três estudos prospetivos que integraram duas metodologias de abordagem, a via convencional, mediante o estabelecimento de uma pesquisa direcionada, e a via exploratória, com o recurso à proteómica. De seguida, enumeram-se os estudos, juntamente com as respetivas perguntas de investigação.

### Estudo 1

*Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males obstructive sleep apnea.*

Neste estudo utilizou-se a metodologia convencional para a pesquisa direcionada de vários biomarcadores de inflamação e do metabolismo, sendo as perguntas de investigação as seguintes:

- Estando a SAOS associada à patologia cardiovascular, a homocisteína poderá ser usada como marcador de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?
- Estando a SAOS associada a distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico, os parâmetros metabólicos poderão servir de biomarcadores de gravidade da SAOS e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?
- Pode a homocisteína e/ou os parâmetros metabólicos possibilitar a priorização diagnóstica e/ou terapêutica dos doentes com SAOS?

**Estudo 2*****Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure.***

Neste estudo utilizou-se a metodologia convencional para a pesquisa direcionada de vários biomarcadores de *stress* oxidativo, sendo as perguntas de investigação as seguintes:

- Estando a SAOS associada à patologia cardiovascular os parâmetros do hemograma (em particular os índices eritrocitários) poderão ser usados como marcador de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?
- Poderão os parâmetros do hemograma possibilitar a priorização diagnóstica e/ou terapêutica dos doentes com SAOS?

**Estudo 3*****Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome.******Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameter.***

Neste estudo utilizou-se a metodologia exploratória para a pesquisa de proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas, sendo as perguntas que servem de base à investigação as seguintes:

- Nos GV dos doentes com SAOS quais são as proteínas diferencialmente expressas e poderão estas servir de biomarcadores de diagnóstico?
- Nos GV dos doentes com SAOS está alterada a expressão de proteínas das vias de *stress* oxidativo?
- Essas proteínas poderão servir de biomarcadores de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP?

# *CAPÍTULO* 3

---

## METODOLOGIA

### 3.1 ORGANIZAÇÃO E GESTÃO

A fim de satisfazer os objetivos, este projeto envolveu um Centro Hospitalar (Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. – CHLN), uma Instituição Nacional de Saúde (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge IP, Lisboa - INSA), uma Faculdade (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa - FCM-UNL), uma Companhia Universitária (BIOTEMPO) e, como consultores, a Universidade de Seattle (suporte na Biologia dos Sistemas). A gestão do projeto ficou a cargo do investigador principal, no âmbito da sua tese de doutoramento, contando com a colaboração dos seus orientadores - a Professora Doutora Cristina Bárbara, aqui também na qualidade de Responsável do Serviço de Pneumologia do CHLN, a Professora Doutora Paula Pinto, aqui também na qualidade de responsável da Unidade de Sono e Ventilação Não Invasiva (CHLN), a Professora Doutora Deborah Penque, aqui também na qualidade de responsável do Laboratório de Proteómica do INSA e o Professor Doutor Palma dos Reis. Coube à equipa do CHLN o recrutamento de doentes e a sua avaliação clínica, polissonográfica e analítica. O grupo do INSA ficou responsável pela aplicação das técnicas de proteómica na pesquisa dos biomarcadores. A interface entre estas equipas coube ao investigador principal.

Este estudo foi conduzido de acordo com as Normas de Boa Prática Clínica – *Note for Guidance on Good Clinical Practice* (CPMP/ICH/135/95) e de acordo com os princípios adotados pela “Declaração de Helsínquia” [305]. O estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. (06/01/2012), da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (20/11/2012) e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa (4/07/2012), bem como da Comissão Nacional de Protecção de Dados (13/08/2012).

Foi da sua responsabilidade fornecer a cada doente, oralmente e por escrito, informação completa e adequada relativamente aos objetivos e métodos do estudo, bem como aos eventuais riscos, para que cada doente desse o seu consentimento informado (anexo). Todos os doentes participaram mediante um consentimento livre e esclarecido e, de acordo com as diretrizes portuguesas (Decreto-Lei nº97/94 de 9 de abril), cada doente assinou um documento em como recebeu informação escrita antes de dar o seu consentimento de participação. Os doentes foram, também, informados acerca do seu direito de recusarem participar ou de se retirarem do estudo em qualquer altura, sem prejuízo da relação médico/doente. Os cuidados médicos ministrados não foram afetados pela anuência ou recusa em participar neste estudo.

### 3.2 TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO

Trata-se de um estudo prospetivo de uma amostra por conveniência de doentes, avaliados na Consulta de Patologia do Sono do CHLN, com a suspeita clínica de roncopatia/SAOS, e que integra a área clínica, analítica e proteómica.

De Outubro de 2012 a Janeiro de 2014 procedeu-se ao recrutamento de doentes sequenciais a partir da Consulta de Patologia do Sono. No âmbito da Consulta, e após o preenchimento do consentimento informado, foi feita uma entrevista e preenchido um questionário, sendo toda a informação colhida armazenada na base de dados criada para o efeito.

**CrITÉrios de inclusão-** Foram incluídos doentes do género masculino, com idades compreendidas entre os 25 e os 60 anos e com clínica sugestiva de roncopatia e de SAOS. A suspeita clínica de roncopatia/SAOS teve como base a presença de duas ou mais das seguintes queixas: sonolência diurna excessiva, roncopatia, apneias visualizadas pelo(a) companheiro(a), sono não reparador, sensação de asfixia ou engasgamento. Os indivíduos foram submetidos a PSG e foram incluídos aqueles que tinham apenas roncopatia (*Respiratory Disturbance Index* - RDI <5 eventos respiratórios por hora de sono) ou SAOS (RDI ≥ 5 eventos respiratórios obstrutivos por hora de sono). Após a caracterização clínica e polissonográfica, foram considerados dois

grupos: o grupo de controlo, que incluiu os doentes com roncopatia, e o grupo de estudo, que incluiu os doentes com SAOS de diferentes gravidades.

**Crítérios de exclusão-** Foram excluídos os doentes com outra patologia do sono (apneias centrais, perturbações do movimento, doenças comportamentais do sono, narcolepsia), trabalho por turno, uso prévio de PAP, uso de oxigenoterapia, doença neuromuscular, doença psiquiátrica não controlada, doença aguda e neoplasia. As mulheres não foram incluídas para evitar os efeitos das variações hormonais sobre as variáveis analisadas.

**Caracterização da população-** Considerando os pressupostos desta investigação, a descoberta de biomarcadores de gravidade e/ou de resposta à terapêutica através da via direcionada e exploratória, a dimensão da amostra ficou sujeita aos condicionalismos do período de estudo e aos critérios utilizados na seleção dos doentes. Foram observados 132 doentes, dos quais 73 tiveram a confirmação de SAOS e 30 eram roncadores. Os restantes 29 doentes foram excluídos por apresentarem outra patologia concomitante do sono ou por não terem realizado PSG ou colhido sangue/urina para avaliação analítica. A caracterização demográfica e analítica desta população encontra-se no capítulo referente aos Resultados.

A partir desta população foram selecionadas amostras de diferentes dimensões, consoante a investigação a realizar de acordo com os estudos desenvolvidos no âmbito dos objetivos específicos.

## **Investigação de Biomarcadores pela Via Convencional**

### **Estudo 1**

*Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males obstructive sleep apnea.*

- a. Avaliação basal de 73 doentes com SAOS e 30 controlos.
- b. Avaliação de 46 doentes com SAOS pré e pós PAP.

## **Estudo 2**

*Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure.*

- a. Avaliação basal de 73 doentes com SAOS (36 ligeiros, 10 moderados e 27 graves).
- b. Avaliação de 48 doentes com SAOS pré e pós PAP.

## **Investigação de Biomarcadores pela Via Exploratória**

## **Estudo 3**

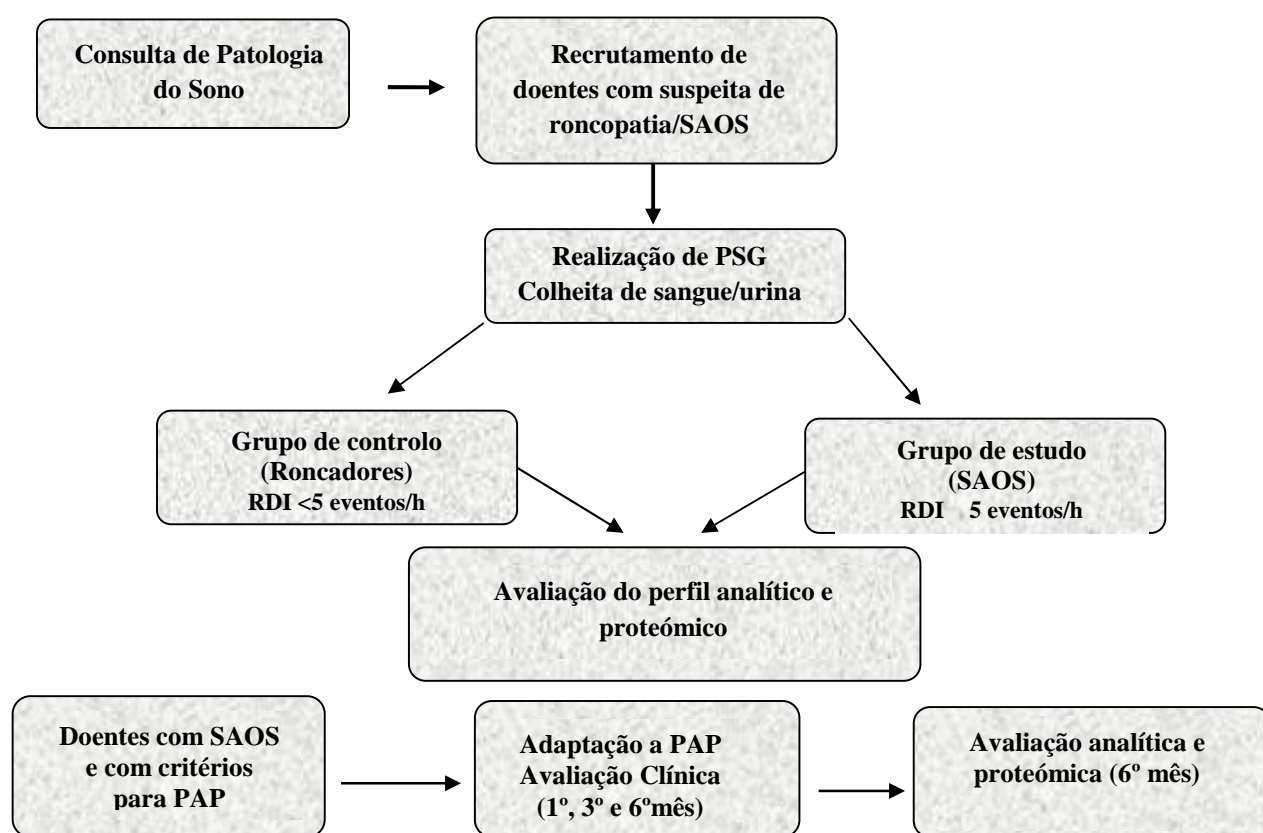
*Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome.*

*Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameter.*

- a. Fase de Descoberta: 12 doentes com SAOS e 12 controlos.
- b. Fase de Validação: 10 doentes com SAOS e 10 controlos; 10 doentes com SAOS antes e após PAP.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 6 apresenta-se o fluxograma do trabalho de investigação que conduziu aos vários estudos.



**Figura 6:** Principais fases da abordagem diagnóstica dos doentes selecionados.

Legenda: RDI: *Respiratory Disturbance Index*; PAP: dispositivos de pressão aérea positiva.



Atendendo aos estudos desenvolvidos para a identificação de biomarcadores de gravidade e de terapêutica, considerou-se essencial a **criação de uma base de dados e de um biobanco**. Para o efeito, juntamente com a empresa BIOTEMPO – Consultoria em Biotecnologia, Lda., foi criada uma base de dados em suporte eletrónico que teve como objetivo albergar a informação clínica dos doentes, bem como os resultados dos exames complementares realizados e, no caso dos doentes sob tratamento com PAP, o registo deste. À base de dados foi associado um biobanco, o primeiro biobanco desta entidade clínica em Portugal, o qual tem a capacidade de armazenar mais de 6,000 amostras de sangue/urina e que ficou sediado no INSA. Para garantir a confidencialidade, cada doente foi identificado segundo um código único, o número do processo hospitalar, e as amostras biológicas foram identificadas com um código de barras usando o *LabeXpertSystem*. A criação da base de dados e do biobanco serviu de suporte a este trabalho de investigação, mas permitirá, também, a realização de futuros estudos epidemiológicos e será crucial para a validação de biomarcadores num maior coorte de doentes.

Os doentes com suspeita clínica de roncopatia/SAOS foram recrutados de forma sequencial a partir da Consulta de Patologia do Sono. De seguida, procedeu-se à **avaliação diagnóstica** dos doentes selecionados, com base na informação clínica e polissonográfica. A **avaliação analítica basal** implicou a colheita de sangue e de urina para a pesquisa direcionada de parâmetros de inflamação, do metabolismo e de *stress* oxidativo (homocisteína, perfis glicídico e lipídico, hemograma e catecolaminas urinárias) e para a pesquisa exploratória de proteínas diferencialmente expressas (análise proteómica). Para tal, a todos os doentes foi colhido sangue e urina no tempo 0 (T0), isto é aquando da realização da PSG. Nos doentes que reuniram critérios para iniciar o tratamento com PAP foi feita a respetiva adaptação, durante o período diurno, por uma técnica de Cardiopneumologia. Foram usados equipamentos de pressão positiva com modalidade automática de ajuste de pressão (S9 - Resmed, Austrália). Estes casos foram avaliados ao 1º, 3º e 6º mês após a adaptação. Nestas visitas foi feita a avaliação clínica que incluiu os seguintes aspetos: qualidade do sono noturno, sonolência diurna, alterações da fadiga, energia, atividade diária e no trabalho. A informação referente ao tratamento com PAP, como adesão, pressões, fugas e índice de apneia-hipopneia residual, também foi registada. Foram ainda pesquisados os eventuais efeitos secundários decorrentes do tratamento instituído, procedendo-se à respetiva

resolução. Ao 6º mês (T6) realizou-se **avaliação analítica após tratamento**. Foi novamente colhido sangue e urina para análise dos mesmos parâmetros laboratoriais e proteômicos avaliados antes do tratamento.

### **Avaliação Clínica**

A **caracterização demográfica e nutricional da amostra** foi realizada através da recolha de dados referentes à idade, habilitações literárias, profissão, hábitos tabágicos, etanólicos e medicamentosos, bem como determinação da pressão arterial, frequência cardíaca, índice de massa corporal, perímetro abdominal e do pescoço.

A pressão arterial foi medida com manga insuflável de tamanho apropriado na posição sentada imediatamente antes da realização da PSG; a circunferência do pescoço foi medida ao nível da proeminência laríngea e a circunferência da cintura foi medida a meia distância entre a margem inferior da última costela e o bordo superior da crista ilíaca. O IMC foi calculado a partir do peso corporal e da altura ( $\text{kg/m}^2$ ). Esta determinação permitiu a caracterização dos doentes com peso normal (IMC entre 18,5 e 24,99  $\text{kg/m}^2$ ), pré obesidade (IMC entre 25,00 e 29,99  $\text{kg/m}^2$ ) e obesidade (classe I – IMC entre 30,00 e 34,99  $\text{kg/m}^2$ ; classe II – IMC entre 35,00 e 39,99  $\text{kg/m}^2$  e classe III se IMC  $\geq 40,00 \text{ kg/m}^2$ ).

A **caracterização da sonolência diurna** foi realizada em todos os doentes, mediante o preenchimento da Escala de Sonolência *Epworth* (tabela 2). A pontuação desta escala varia de um valor mínimo de 0 até um máximo de 24. Em geral, uma pontuação superior a 10 é consistente com sonolência diurna excessiva [306]. Para efeitos de análise da sonolência diurna excessiva, esta distinguiu-se entre ativa (perguntas 6 e 8) e passiva (perguntas restantes), sendo que na primeira se pode obter uma pontuação máxima de 6, enquanto na segunda se pode obter uma pontuação máxima de 18 [306].

Indique numa escala de 0 a 3 qual a possibilidade de adormecer (sem estar cansado) em alguma destas situações (se alguma destas situações não ocorrer com frequência, suponha o que aconteceria):	
1 – Sentado a ler	
2 – A ver televisão	
3 – Sentado em público	
4 – Como passageiro em viagens de mais ou menos uma hora	
5 – Deitado a meio da tarde	
6 – Sentado e falando com alguém	
7 – Sentado tranquilamente após as refeições, sem ter bebido álcool	
8 – Conduzindo, parado num semáforo, em filas...	
Pontuação: 0 – nenhuma possibilidade; 1 – ligeira; 2 – moderada; 3 – forte	

**Tabela 2:** Escala de Sonolência de *Epworth*, adaptada.

### Avaliação Polissonográfica

Os doentes elegíveis realizaram PSG no Laboratório do Sono, do Serviço de Pneumologia do CHLN. A PSG foi realizada no equipamento Sistema Embla S7000 (Embla; USA) e consistiu no registo simultâneo do electroencefalograma (4 canais), do electro-oculograma (2 canais), do electromiograma sub-mentoniano (1 canal) e tibial anterior (2 canais), do electrocardiograma (registado pela derivação II modificada), do ronco, do esforço respiratório (detetado através das bandas torácica e abdominal), do fluxo oronasal, do pulso, da oximetria transcutânea e da posição corporal.

Os registos polissonográficos foram avaliados visualmente, tendo-se procedido à análise do sono e respetivo estadiamento, segundo os critérios *Rechtschaffen e Kales* [307], bem como à análise manual dos eventos anómalos:

- a) Procedeu-se à caracterização da **macroestrutura do sono** segundo [308], através da determinação do tempo total do sono, eficiência do sono, distribuição das fases do sono, respetiva duração e latência.
- b) Quanto aos **eventos anómalos** foram determinadas as apneias, hipopneias, RERA, ronco, dessaturação do oxigénio, despertares e distúrbios do movimento. No que

concerne aos eventos respiratórios, foram respeitadas as diretrizes da AASM de 2012 [308], e que vieram substituir as anteriores [309, 310].

- c) Com base nestes dados foram estabelecidos **índices diagnósticos**, em particular os índices de apneia-hipopneia, de distúrbio respiratório, de roncopatia, de dessaturação de oxigénio, de despertar e o de movimentos periódicos dos membros.

O **índice de apneia-hipopneia** foi determinado com base na soma das apneias e hipopneias que ocorreram por hora de sono, o **índice de distúrbios respiratórios** foi estabelecido com base na soma das apneias, hipopneias e RERA ocorridos por hora de sono, e o **índice de dessaturação de oxigénio** (*Oxygen Dessaturation Index* - ODI) foi calculado como o número total de dessaturações da oxihemoglobina iguais ou superiores a 4% abaixo da linha basal por hora de sono. O **índice de despertares**, isto é, o número de despertares por hora de sono foi calculado como o número total de despertares dividido pelo tempo total de sono.

- d) Para o **diagnóstico** de SAOS foram usados os critérios constantes na última Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono [3], e que vieram substituir os anteriormente publicados pela AASM [309, 311, 312].

Esses critérios incluem a presença ou ausência de sintomas e a frequência de eventos respiratórios durante o sono, sendo o diagnóstico confirmado se 1 ou as 2 condições se verificarem:

- 5 eventos respiratórios, predominantemente obstrutivos (apneias obstrutivas e mistas, hipopneias ou RERA), por hora de sono ou tempo de registo num doente com uma ou mais das seguintes condições: sonolência, sono não reparador, fadiga ou insónia; sensação de asfixia ou engasgamento; ronco habitual; pausas respiratórias visualizadas; hipertensão, alteração do humor, disfunção cognitiva, doença coronária, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, fibrilhação auricular ou diabetes mellitus tipo 2.
- 15 eventos respiratórios, predominantemente obstrutivos, por hora de sono ou tempo de registo independentemente dos sintomas ou comorbilidades associadas.

### **Avaliação Analítica pela Via Convencional**

Procedeu-se à caracterização do **perfil analítico**, através da colheita de sangue na manhã da PSG e após um jejum de 12 horas, e de urina de 24 horas. Estas colheitas tiveram como objetivo determinar vários parâmetros segundo os métodos padronizados do Laboratório de Patologia Clínica do CHLN, tendo sido usados os valores de referência do mesmo. A avaliação analítica direcionada englobou a determinação dos seguintes parâmetros:

#### **Estudo 1**

*Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males obstructive sleep apnea.*

- a) Determinação da **homocisteína sérica**.
- b) Caracterização do **metabolismo lipídico** que foi possível através da determinação do colesterol total, LDL e HDL e dos triglicéridos.
- c) Caracterização do **metabolismo glicémico** que foi possível através da determinação da glicemia, insulina, HbA1c e cálculo da resistência à insulina. Por motivos organizacionais, neste trabalho não se procedeu ao teste da tolerância da glicose.

Nos participantes com níveis de glicose e insulina em jejum normais foi usado o índice HOMA, como medida de resistência à insulina [313]. O modelo da avaliação da homeostase da resistência à insulina (*Homeostasis Model Assessment of insulin resistance* - HOMA-IR) foi desenvolvido por Matthews e colaboradores [313] e tem sido usado para estimar a resistência à insulina em estudos clínicos e epidemiológicos [314]. Comparado com o método padrão, método euglicémico de clampagem na quantificação da resistência à insulina [315], tem-se revelado como uma ferramenta robusta e mais conveniente para valores de glucose em jejum menores que 126 mg/dl. O HOMA-IR é uma medida da sensibilidade basal da insulina e da função das células e é calculado como um produto entre a glucose em jejum ( $G_0$ ) (mmol/l) e a insulina em jejum ( $I_0$ )

( $\mu\text{U/l}$ ) dividido pela constante 22,5:  $\text{HOMA} = (G_0 \times I_0) / 22,5$  [313, 316]. O modelo atualizado do índice HOMA [317] foi incorporado num programa computadorizado HOMA Calculator v2.2.2 (*The Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology & Metabolism: Diabetes Trial Unit. HOMA Calculator. 2009* [<http://www.dtu.ox.ac.uk/>]) que foi utilizado neste estudo. Este índice tem por base a fisiologia estacionária e inclui limites para a glucose de 3-25 mmol/l e para a insulina de 20-400 pmol/l, sendo que valores fora destes limites são considerados não estacionários e não devem ser avaliados. O método HOMA tem sido aplicado em todos os grupos étnicos. No entanto, a ausência de standardização quanto aos valores de referência do HOMA-IR tem prejudicado a sua divulgação clínica, uma vez que há uma grande variedade de níveis que definem resistência à insulina (revisão em [318]), variando de 1,6 a 3,8 conforme as áreas geográficas. O estudo de Gayoso-Diz e colaboradores, realizado na população espanhola, reportou um ponto de corte para o HOMA-IR de 2,05. Os autores justificam este valor pelo facto de permitir a identificação de doentes que apresentem múltiplos fatores de risco cardio-metabólico [318].

- d) Determinação das **catecolaminas urinárias** (adrenalina, noradrenalina e dopamina). Três dias antes da determinação destas últimas, os doentes cumpriram uma dieta, na qual era proibida a ingestão de alimentos como álcool, beterraba, bananas, abacate, tomate, ameixa, ananás, kiwi, laranjas, nozes, avelãs, baunilha (doces e confeitaria), chá, café e chocolate. Após os 3 dias de dieta, a colheita da urina era feita para um recipiente próprio contendo ácido clorídrico e durante um período de 24 horas que terminava na manhã da PSG.

## Estudo 2

### *Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure.*

Caracterização do **hemograma completo** com determinação da contagem dos GV, hematócrito, hemoglobina, hemoglobina globular média, concentração média da hemoglobina globular, volume globular médio, *Red Blood Cell distribution width* (RDW), contagem de leucócitos e plaquetas, *platelet distribution width* (PDW) e volume médio das plaquetas.

### **Avaliação Analítica pela Via Exploratória**

Procedeu-se à pesquisa exploratória das proteínas diferencialmente expressa através da **análise proteómica**. Esta análise foi realizada no INSA, pelo Laboratório de Proteómica do Departamento de Genética, que é dirigido pela Professora Doutora Deborah Penque, tendo contado com a colaboração de uma equipa de profissionais especializados na área.

### **Estudo 3**

*Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome.*

*Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameter.*

Devido ao facto de o sangue ter um papel fundamental nos estudos dirigidos à descoberta de biomarcadores, uma vez que perfunde todos os tecidos do organismo, foi usado um dos seus constituintes, glóbulos vermelhos, para a avaliação do perfil proteico. Assim, as amostras de sangue enviadas para o INSA foram processadas (separação em plasma, *buffy coat* e glóbulos vermelhos) e as aliquotas armazenadas a -80°C para posterior análise proteómica. Nos **Glóbulos Vermelhos** a separação e análise das proteínas citosólicas foram realizadas através da técnica *Two-dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) associada à espectrometria de massa (segundo a técnica MALDI-TOF/TOF).

---

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS para o programa *Windows* (SPSS 20 Inc., Chicago, IL, USA). Nas variáveis quantitativas apresentam-se o valor da média e respetivo desvio padrão (DP). As variáveis categóricas foram expressas em frequência absoluta e relativa. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para analisar as correlações entre variáveis do tipo quantitativo. Para comparar os valores antes e após o tratamento utilizou-se o Teste *t* de Student para as amostras emparelhadas. Para comparar os grupos de estudo e de controlo relativamente às variáveis analisadas utilizou-se o Teste *t* de Student para amostras independentes. ANOVA *one-way* foi usada para testar a diferença entre variáveis quantitativas entre 3 ou mais grupos. Para as variáveis quantitativas com distribuição não normal apresentou-se o valor da mediana e da amplitude interquartilica. Para analisar as correlações entre variáveis quantitativas sem distribuição normal utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Utilizou-se o Teste de Mann-Whitney *U*, em alternativa ao Teste *t* de Student, para amostras independentes e o Teste de Wilcoxon, em alternativa, ao Teste *t* de Student para amostras emparelhadas quando os pressupostos dos testes paramétricos não se encontravam satisfeitos. Os pressupostos destes testes, designadamente o pressuposto de normalidade de distribuição de valores e o de homogeneidade de variâncias, foram analisados respetivamente com o Teste de Shapiro-Wilk ( $N < 50$ ) e com o Teste de Levene. As variáveis categóricas foram analisadas usando o Teste Exato de Fisher. O nível de significância foi fixado para  $p = .05$ .



# *CAPÍTULO*4

## RESULTADOS

### Caracterização da população recrutada

A partir da Consulta foram recrutados de forma sequencial 132 doentes. Dos doentes recrutados 30 apresentavam roncopatia (grupo de controlo), 73 apresentavam SAOS de diferentes gravidades (grupo de estudo) e 29 doentes foram excluídos. A tabela 3 apresenta a caracterização clínica e polissonográfica dos doentes selecionados.

	TOTAL	Roncadores	SAOS	Roncadores vs SAOS
	N = 103	N = 30	N = 73	Sig.
Idade (anos) (média/DP)	46/8	45/10	46/8	0,354
Tabagismo (n/%)	69/67,0	21/70,0	48/65,8	0,681
Consumo de Alcool (n/%)	66/64,1	15/50,0	51/69,9	0,057
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) (média/DP)	29,4/3,8	27,4/3,3	30,2/3,7	0,001
Doença Cardíaca (n/%)	55/53,4	13/43,3	42/57,5	0,193
Doença Respiratória (n/%)	15/14,6	2/6,7	13/17,8	0,188
Dislipidémia (n/%)	49/47,6	4/13,3	45/61,6	<0,001
Diabetes (n/%)	7/6,8	1/3,3	6/8,2	0,374
Escala de EPW (média/DP)	9,5/4,8	9,3/5,1	9,5/4,7	0,843
RDI (média/DP)	20,4/23,3	2,8/1,3	27,6/24,2	<0,001
T90 (média/DP)	5,6/13,2	1,6/8,1	7,2/14,5	0,047
Eficiência do Sono (média/DP)	79,2/14,4	77,3/14,4	79,1/14,5	0,407
SpO <sub>2</sub> mínima (média/DP)	84,1/7,5	88,5/4,6	82,3/7,7	<0,001
ODI (média/DP)	16,8/22,5	2,2/2,9	22,8/24,2	<0,001

**Tabela 3:** Caracterização clínica e polissonográfica dos doentes selecionados. Legenda: DP: desvio-padrão; EPW: Escala de *Epworth*; IMC: índice de massa corporal; ODI: índice de dessaturação de oxigénio; RDI: índice de distúrbio respiratório; T90: tempo com saturação abaixo de 90%.

Em termos de características demográficas, o grupo de roncadores e o grupo de doentes com SAOS eram semelhantes em relação à idade, hábitos tabágicos e etanólicos ativos e ausência de sonolência diurna, avaliada pela escala de sonolência de *Epworth*. Contudo, a prevalência de dislipidémia foi maior nos doentes com SAOS, sendo estes

também mais obesos (IMC médio de 30,2 kg/m<sup>2</sup>) do que os roncoadores (IMC médio de 27,4 kg/m<sup>2</sup>) e a diferença entre estes grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$  e  $p = 0,001$ , respetivamente). Em termos de outras comorbilidades (patologia cérebro/cardiovascular, patologia respiratória e diabetes), estes grupos eram semelhantes a nível estatístico. Quanto à caracterização polissonográfica, estes grupos eram diferentes em termos estatísticos. Em termos de RDI, o grupo SAOS apresentou um RDI médio de 27,6 eventos/hora de sono, enquanto o grupo de roncoadores apresentou um RDI médio inferior a 5 eventos/hora de sono ( $p < 0,001$ ). Ainda quanto à dessaturação noturna, esta foi estatisticamente maior no grupo de doentes com SAOS.

Foi realizada a avaliação analítica dos doentes recrutados, a qual incluiu os seguintes parâmetros: homocisteína, perfis glicémico e lipídico, as catecolaminas urinárias e o hemograma.

	TOTAL	Roncoadores	SAOS	Roncoadores vs. SAOS
	N= 103	N = 30	N = 73	Sig.
Glucose (mg/dL) (média/DP)	101,0/25,8	101,2/31,3	100,9/23,4	0,951
Hemoglobina Glicosilada (%) (média/DP)	5,8/0,8	5,8/1,0	5,8/0,8	0,957
Insulina (mU/L) (média/DP)	14,7/8,6	12,7/6,8	15,5/9,1	0,124
HOMA-IR (média/DP)	3,8/2,8	3,3/2,8	4,0/2,8	0,241
Colesterol total (mg/dL) (média/DP)	192,1/37,7	185,9/41,3	194,6/36,1	0,290
Colesterol LDL (mg/dL) (média/DP)	121,0/31,6	117,2/33,4	122,6/30,9	0,435
Colesterol HDL (mg/dL) (média/DP)	44,7/10,1	44,7/10,4	44,7/10,0	1,000
Triglicéridos (mg/dL) (média/DP)	134,6/79,3	121,0/68,0	140,2/83,3	0,265
Homocisteína (μmol/L) (média/DP)	15,2/3,4	14,7/3,3	15,3/3,5	0,399
Adrenalina (μg/24 h U) (média/DP)	19,9/15,5	17,7/16,3	20,8/54,2	0,765
Nor-adrenalina (μg/24 h U) (media/SD)	85,7/180,4	64,6/28,1	94,3/213,4	0,45
Dopamina (μg/24 h U) (média/DP)	434,6/771,5	373,9/197,0	459,5/908,5	0,611
Contagem de Eritrócitos (x10 <sup>12</sup> /L) (média/DP)	5,06/0,36	5,09/0,37	5,0/0,4	0,505
Hemoglobina (g/dL) (média/DP)	15,32/1,03	15,34/0,88	15,3/1,1	0,907
Hematócrito (%) (média/DP)	45,06/3,04	45,2/2,54	45,0/3,2	0,804
VGM (fL) (média/DP)	89,15/4,27	88,64/4,66	89,4/4,1	0,440
RDW (%) (média/DP)	13,44/0,69	13,67/0,67	13,4/0,7	0,030
Contagem de Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L) (média/DP)	231,96/53,53	232,90/45,53	231,6/57,4	0,910
VPM (fL) [mediana (IQR)]	8,8/1,3	8,75/1,5	8,8/1,3	0,835
PDW (%) (média/DP)	48,31/7,24	46,7/6,51	49,0/7,5	0,149

**Tabela 4:** Caracterização analítica dos doentes selecionados. Legenda: DP: desvio-padrão; HOMA-IR: resistência à insulina determinada pelo método HOMA, VGM: volume globular médio, RDW: *Red Blood Cell distribution width*, VPM: volume médio das plaquetas, PDW: *platelet distribution width*; IQR: *Interquartil Range*.

De forma resumida, não se detetaram diferenças estatisticamente significativas relativamente à homocisteína, perfis glicémico e lipídico, catecolaminas urinárias e parâmetros do hemograma entre os doentes com SAOS e os roncadores (tabela 4), exceto com relação ao RDW médio. Este último revelou-se estatisticamente diferente entre os roncadores e os doentes com SAOS ( $p=0,030$ ), apresentado-se maior no primeiro grupo (13,67% e 13,4%, respetivamente).

**De seguida, apresentam-se os estudos desenvolvidos.**

**Estudo 1 – Efeitos do tratamento por pressão área positiva nos biomarcadores cardiovascular e metabólicos em homens com apneia obstrutiva do sono**

*Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males obstructive sleep apnea*

(A Feliciano *et al.*, aceite para publicação na Revista Portuguesa de Pneumologia)

---

**Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males with obstructive sleep apnea**

Amélia Feliciano<sup>1\*</sup>, M João Oliveira<sup>2</sup>, Ana Cysneiros<sup>3</sup>, Cristina Martinho<sup>4</sup>, Roberto Palma Reis<sup>5</sup>, Deborah Penque<sup>6</sup>, Paula Pinto<sup>7</sup>, Cristina Bárbara<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Graduated Assistant of Pneumology in Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte and PhD student in Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. E-mail address: amelia.feliciano@chln.min-saude.pt. Phone: 351917342101 \*Corresponding author.

<sup>2</sup>Resident of Pneumology in Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia e Espinho, EPE, Vila Nova de Gaia, Portugal. E-mail address: maria.joaooliveira@chvng.min-saude.pt.

<sup>3</sup>Resident of Pneumology in Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal. E-mail address: taiacysneiros@gmail.com.

<sup>4</sup>Cardiopulmonary Technician in Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal. E-mail address: crismartinho@netcabo.pt.

<sup>5</sup>Coordinator of Cardiology Unit in Hospital Pulido Valente, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Professor in Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. E-mail address: palma.reis@fcm.unl.pt.

## **Introduction**

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a common sleep and chronic respiratory disorder<sup>1,2</sup>, associated with cardiovascular<sup>3, 4, 5</sup> and metabolic (such as obesity<sup>6</sup>, dyslipidemia<sup>7</sup> and type 2 diabetes<sup>8</sup>) complications. It has been difficult to determine if these are due to OSAS or to associated risk factors. Sleep fragmentation and intermittent hypoxia are some mechanisms contributing to OSAS complications<sup>9, 10</sup>, which improve with positive airway pressure treatment (PAP). However, the impact of PAP on other mechanisms involved is still not well characterized. Some oxidative stress biomarkers have been associated to OSAS morbidity<sup>11</sup>. Still controversy remains regarding the best diagnostic/prognostic marker. An example is homocysteine (Hcy), which is considered a “promising” marker<sup>12</sup>. Hcy is an intermediate product in the biosynthesis of methionine and cysteine<sup>13</sup>, and is determinant of the methylation cycle<sup>14</sup>. Hcy levels in adults follow a circadian variation<sup>15</sup>, being lower in the morning. Studies reported Hcy as an independent risk factor for atherosclerosis<sup>16, 17</sup>, cerebral and cardiovascular diseases (CVD)<sup>13, 18-24</sup>, being related with their prognosis<sup>18</sup>. The proposed mechanisms are its adverse effects on vascular structure and function<sup>25</sup>,

hypercoagulability state<sup>23</sup>, and depletion of nitric oxide<sup>26</sup>. Moreover, dyslipidemia, diabetes, cancer, renal, and thyroid dysfunction<sup>13, 23</sup> are associated with elevated Hcy. Also, older age, male gender, various drugs, tobacco/coffee/alcohol, and vitamins deficiency<sup>13, 23</sup>. Hcy has been proposed as an OSAS biomarker regarding its relationship with CVD. Studies show higher levels of Hcy in OSAS with<sup>27-30</sup> or without<sup>31, 32</sup> pre-existing cardiac disease. Moreover there are contradictory studies reporting the effect of PAP on Hcy levels<sup>29, 33-37</sup>.

The aim of this study was to analyse Hcy levels in snorers and OSAS patients, its correlation with OSAS severity, and response to PAP. Additionally, glycemic and lipidic parameters were also evaluated.

## Material and Methods

This prospective study included one hundred three consecutive male subjects with suspicion of OSAS, who were evaluated at a Sleep Clinic. Demographic data included age, body mass index (BMI), Epworth sleepiness scale and medical history. Exclusion criteria were female gender (to avoid hormonal influence), other sleep disorders, neuromuscular, renal, and thyroid disease, heart failure, cancer, acute disease, and previous PAP.

All patients underwent an overnight polysomnography (PSG) using Embla S7000 System (Embla; USA) with a technician monitoring. Sleep recording and events were manually analysed according to standard criteria<sup>38</sup>. The respiratory disturbance index (RDI), oxygen desaturation index (ODI), percentage of time with saturation under 90% (T90) and lowest oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) were calculated. Based on RDI 5 obstructive events/hour of sleep, patients were diagnosed as OSAS (n=73) and grouped into mild (RDI 5-14.9), moderate (RDI 15-29.9), and severe (RDI ≥ 30). Later, in pre/post OSAS treatment analysis, mild and moderate patients were combined (RDI < 30), in order to evaluate the extreme of disease spectrum.

To calculate the sample size we focused in the main objective, that is Hcy analysis before/after PAP treatment. The sample size was calculated with PS software, version 3.1.2. It was planned a study of a continuous response variable from matched pairs of study subjects. Prior data indicated that the difference in the response of matched pairs was normally distributed with standard deviation 2. If the true difference in the mean response of matched pairs is 0.95, the sample size need to be of 37 pairs of subjects to be able to reject the null hypothesis that this response difference is zero with probability (power) 0.8 (i.e. beta 0.20). The type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05 (i.e. alfa 0.05).

According to criteria<sup>39</sup>, PAP therapy with automatic devices (S9, Resmed, Australia) was prescribed for 46 patients in severe disease or in disease of any severity when associated with excessive diurnal sleepiness and/or cardio/cerebrovascular complications. These patients were evaluated at six months for compliance registration. As

described<sup>41</sup>, more than 4 hours use/night for at least 70% of nights was considered as acceptable compliance. After PAP initiation, no more indications (excluding healthy lifestyle) were given, assuming a real life scenario.

Venous blood samples were collected after PSG and a 12-hour fasting period, into EDTA-coated polypropylene tubes. At six months of PAP a second morning blood sample was collected. The collected blood was processed between one and two hours to determine Hcy (Chemiluminescence (CLIA), ADVIA Centaur xp, Siemens). Additionally, parameters of glycemie profile were determined, such as glucose (Enzyme UV Hexokinase - ADVIA 2400 Siemens), hemoglobin A1c (HbA1c) (HPLC - Variant II BioRad), insulin (chemiluminescence (CLIA), ADVIA Centaur xp, Siemens) and insulin resistance (calculated by homeostatic model assessment of insulin resistance - HOMA-IR). Parameters of lipidic profile were, also, determined such as total cholesterol (CHOD-PAP (enzymatic colorimetric) ADVIA 2400, Siemens), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (by calculation), high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (HDL Plus 2<sup>nd</sup> generation elimination/catalase ADVIA 2400, Siemens) and triglycerides (Enzymatic colorimetric (GPO) ADVIA 2400, Siemens). The HOMA-IR was determined by the product between fasting plasma glucose and insulin concentration, which has a reasonable linear correlation with the gold standard of insulin resistance measurement (hyperinsulinemic-euglycemic clamp)<sup>40</sup>.

All subjects underwent restriction of alcohol, tea, coffee, chocolate, beetroot, banana, avocado, tomato, plum, pineapple, kiwi, orange, nut, hazelnut, vanilla candies, and confectionery during the three days prior to PSG. Patients underwent 24 hours urine collection (into a hydrochloric acid container and stored at 4°C) for catecholamines determination (adrenaline, nor-adrenaline and dopamine) (HPLC – BioRad).

The study protocol was approved by the local ethics committees and all patients gave written informed consent.

Statistical analyses were performed using SPSS for windows software (SPSS 20 Inc., Chicago, IL, USA). All variables were tested for normality of the distribution using Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables with normal distributions were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and categorical variables in numbers (percentages). Pearson's analysis was performed for correlations between parametric variables. Independent-samples T-test was used for comparisons between independent groups for values that were normally distributed and paired-samples T-test was used to compare variables normally distributed before and after PAP treatment. Categorical variables were compared using  $\chi^2$  test. Results were considered statistically significant when p value was  $<0.05$ .

### Results



Clinical and analytical evaluation of snorers and OSAS patients are shown in Table 1. There were no statistically significant differences regarding demographic and analytical parameters. Instead, the existence of known dyslipidemia and BMI were higher in OSAS patients ( $p<0.001$ ,  $p=0.001$ , respectively). HOMA-IR, total cholesterol, and urinary noradrenaline were higher than normal range in OSAS patients and Hcy was higher than normal range in both groups.

Concerning OSAS patients, there were no statistically differences between mild-moderate (46, 63%) and severe (27, 37%) regarding demographic parameters. Instead, dyslipidemia and BMI were higher in severe OSAS patients ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ , respectively). Glycemia, HbA1c, insulin and HOMA-IR were higher and HDL cholesterol was lower in severe group ( $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ , respectively). Moreover, HbA1c, HOMA-IR, triglycerides, and urinary catecholamines were higher than normal range in severe OSAS patients and total cholesterol and Hcy in both groups.

Some metabolic parameters were slightly correlated with OSAS severity. Glycemia, HbA1c, and triglycerides were positively correlated with RDI ( $p<0.05$ , Pearson correlation). Glycemia and HbA1c were negatively correlated with lowest SpO<sub>2</sub> ( $p<0.05$ , Pearson correlation). Instead, insulin and HOMA-IR were positively correlated with RDI, T90, and ODI ( $p<0.001$ , Pearson correlation) and negatively correlated with lowest SpO<sub>2</sub> ( $p<0.001$ ) (Table 2).

Clinical and analytical evaluation of OSAS treatment patients are shown in Table 1 and 3. 46 OSAS patients underwent PAP (22 (48%) were mild-moderate and 24 (52%) were severe). Patients showed a mean compliance of 4.37 hours/night. Additionally in PAP follow up, weight and smoking habits were always asked and there were no changes in both parameters. After six months of treatment, OSAS patients showed a statistical decrease in Hcy, glycemia, total and LDL cholesterol ( $p<0.05$ ) (Table 3). Instead, in severe OSAS only glycemia and LDL cholesterol showed a significant reduction ( $p<0.05$ ).

## Discussion

This study showed after six months of PAP, homocysteine, glycemia, total and LDL cholesterol decrease in OSAS patients pointing to cardiovascular/metabolic protective role of this treatment.

In our study, Hcy was similar in snorers and OSAS patients, and also in different OSAS severities, although being higher than normal range. Hcy is an emerging independent risk factor for CVD, but it is not clear its association with OSAS. Both smoking and obesity may affect Hcy levels<sup>42-47</sup>, which could be confounders in the association with CVD. In this study, smoking habits and prevalence of CVD were similar between snorers and OSAS patients, and between different levels of OSAS severity. Concerning obesity, snorers and OSAS patients were obese, still OSAS patients presented a higher BMI, which could influence the Hcy levels. The presence of obesity even in snorers is

probably responsible for OSAS suspicion and referral to sleep clinic<sup>48</sup>. Also, several diseases such as dyslipidemia<sup>13, 23</sup> are associated with elevated levels of Hcy, and this disease was more prevalent in OSAS patients.

A meta-analysis (432 subjects) showed higher Hcy levels in OSAS than in controls<sup>49</sup>, especially when BMI  $\geq 30$ , age  $< 50$  years and severe OSAS. Other authors<sup>50, 51</sup> also reported higher Hcy levels in severe OSAS. A recent study reported higher Hcy levels in patients with coronary artery disease, with OSAS and with both diseases<sup>30</sup>, and the highest values for Hcy were observed in the latter group. Further, there was no correlation between Hcy levels and oxygen desaturation, as showed in the present study. Contrary to these results, some studies did not report increased levels of Hcy in OSAS patients with<sup>34, 35</sup> or without associated CVD<sup>28, 29, 36</sup>. Although, Hcy was not correlated with sleep parameters, in OSAS patients it decreased for normal values after 6 months of PAP therapy, which may suggest that its levels could in part be related with OSAS. These results are similar to a study of 12 OSAS patients with CVD, which reported a reduction in Hcy levels after PAP therapy<sup>33</sup>. This behaviour under PAP was confirmed in a recent meta-analysis<sup>52</sup>. On the contrary, other studies<sup>29, 35-37</sup> reported that PAP therapy or mandibular advancement device<sup>37</sup> did not influence Hcy levels in OSAS patients.

Previous studies suggest that OSAS is associated with dyslipidemia<sup>7</sup> and type 2 diabetes<sup>8</sup>. In fact, in this study dyslipidemia was more prevalent in OSAS patients comparing to snorers, although both groups showed similar glycaemic and lipidic profiles.

Indeed, some authors found that OSAS is independently associated with disorders of lipid metabolism<sup>53</sup>, mainly due to intermittent hypoxia<sup>54</sup> and sleep fragmentation<sup>55</sup>. Furthermore, as in this study, triglycerides were associated with OSAS severity<sup>53</sup>. This is an important issue once dyslipidemia is a major cause of atherosclerotic CVD<sup>56</sup>.

Moreover, severe OSAS showed a change in glycaemic profile, even in absence of known diabetes, probably suggesting a pre-diabetic state, and it was correlated with sleep parameters (RDI and nocturnal desaturation). A condition characterized by insulin resistance and glucose intolerance is known as prediabetes<sup>57</sup>. Individuals presenting this state are at risk of CVD and the majority will develop diabetes<sup>58, 59</sup>, putting our severe patients in an increased risk for both disorders. These results are in agreement with a meta-analysis which confirmed that moderate/severe OSAS increases the risk of development of type 2 diabetes<sup>60</sup>, even following adjustment of obesity, age, co-morbidities and medication use<sup>61</sup>. Sleep fragmentation and intermittent hypoxia<sup>62</sup> seem to be involved in carbohydrate dysregulation in OSAS, with impaired lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and sympathetic nervous system activation<sup>63</sup>.

Concerning the evaluation of both profiles after PAP therapy, OSAS patients presented a statistical change in glycaemic and lipidic profiles, with a decrease in glucose, total and LDL cholesterol. Some trials provide evidence that

PAP therapy may improve glucose metabolism<sup>64</sup> especially in sleepy patients<sup>65</sup>. However, other studies do not support this improvement<sup>66</sup>, but the duration of treatment could be an explanation. A recent study has shown improvement in glucose metabolism with PAP therapy even in OSAS patients (overweight or obese) with prediabetes<sup>67</sup>. Additionally, even in non-diabetic adults with OSAS, two meta-analyses have reported that PAP therapy modestly decreases HOMA-IR<sup>68, 69</sup>. Another study in diabetic OSAS patients has shown that one month of PAP therapy led to reduction of fasting glucose, HbA1c and HOMA-IR, without change in BMI<sup>70</sup>.

A meta-analysis reported that PAP therapy decreases total cholesterol level, especially in OSAS patients who are younger, more obese, and who use PAP for a longer period ( > 12 weeks)<sup>71</sup>. However, in this meta-analysis PAP had no effect on fasting glucose or HOMA-IR. Also in a meta-regression analysis, PAP improved total and LDL cholesterol, with an increase in HDL cholesterol<sup>7</sup>. In a more recent meta-analysis<sup>72</sup> reported that PAP significantly lowered total cholesterol, triglyceride, and HDL, but not LDL, particularly in moderate-severe patients, good compliance and daytime somnolence. Although the magnitude of lipid reduction was modest and only significant in studies where autonomic hyperactivity was also lowered by PAP. In fact, in the present study OSAS patients presented a higher prevalence of dyslipidemia and after PAP there was a decrease in total and LDL cholesterol, without changing lifestyle habits. Moreover, urinary catecholamines decrease to normal levels, however without statistical significance, which could have conditioned lipid lowering effect of PAP.

Treatment with PAP in OSAS may improve dyslipidemia through ameliorating hypoxia, inflammation<sup>73</sup> and insulin resistance<sup>74</sup>. Although, dyslipidemia in OSAS patients is far from being a simple process because, besides OSAS severity, several factors can contribute for it such as obesity, diet, and exercise<sup>34, 53, 75, 76</sup>. This fact and probably sample size could explain that the remainder of lipidic profile (triglyceride, total and HDL cholesterol) was not affected by PAP in this study.

This study showed a similar pattern of urinary catecholamines between snorers and OSAS patients and between OSAS patients of different severities. Additionally, in severe OSAS patients urinary catecholamines were higher than normal range. Although urinary catecholamines were not correlated with sleep parameters, after six months of PAP, they decreased to normal levels, nonetheless without statistical significance. These results may be due to sample size because previous studies reported that in OSAS there is an increase in sympathetic activity, independently of obesity<sup>77</sup>. In fact, Pinto et al<sup>78</sup> reported 24-hour urinary norepinephrine levels significantly higher in severe OSAS than in mild-moderate, with a significant reduction after one month of PAP. Another study<sup>79</sup> reported that PAP withdrawal resulted in rise in urinary noradrenaline and that was positively associated with hypoxaemia severity.

Reduction of sympathetic activity can be a potential mediator of metabolic benefit from PAP (with improvement of glucose levels) as shown in study by Pamidi et al<sup>67</sup>.

There are some limitations of this study, such as small sample size, female exclusion, and BMI differences between groups. Furthermore, drugs and diseases that interfere with vitamin B metabolism are potential causes for higher Hcy concentrations<sup>80</sup>, and these vitamins were not determined in this study.

### Conclusion

The present study demonstrated an association between glucose metabolism parameters and triglycerides with OSAS severity, contributing to the complexity of the process leading to cardiovascular/metabolic complications in this disorder. Moreover, Hcy, glycemic and lipidic profiles changed significantly after 6 months of PAP therapy in OSAS patients, supporting its cardiovascular and metabolic protective effect.

In conclusion, our study has reinforced the importance of analytical cardiovascular/metabolic evaluation as complementary tool of diagnosis/treatment response in OSAS patients.

### References

1. Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(2): 144–53.
2. Franklin K, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-a review on the epidemiology of sleep apnea. *J. Thorac. Dis.* 2015; 7, 8: 1311–22.
3. Martinez D, Klein C, Rahmeier L, da Silva RP, Fiori CZ, Cassol C, et al. Sleep apnea is a stronger predictor for coronary heart disease than traditional risk factors. *Sleep Breath.* 2012; 16: 695–701.
4. Macey PM, Kumar R, Woo MA, Yan-Go FL, Harper RM. Heart rate responses to autonomic challenges in obstructive sleep apnea. *PLoS One* 2013; 8:e76631.
5. Floras JS. Sleep apnea and cardiovascular risk. *J Cardiol.* 2014; 63(1): 3–8.
6. Ryan S, Crinion SJ, McNicholas WT. Obesity and sleep-disordered breathing—when two 'bad guys' meet. *QJM.* 2014; 107: 949-54.
7. Nadeem R, Singh M, Nida M, Waheed I, Khan A, Ahmed S, et al. Effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta regression analysis. *J Clin Sleep Med.* 2014; 10: 475-89.
8. Pamidi S, Tasali E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link? *Front Neurol.* 2012; 3: 126.

9. Dempsey J, Veasey S, Morgan B, O'Donnell C. Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev.* 2010; 90(1): 47–112.
10. Lévy P, Ryan S, Oldenburg O, Parati G. Sleep apnoea and the heart. *Eur Respir Rev.* 2013; 22: 333-52.
11. Feng J, Zhang D, Chen B. Endothelial mechanisms of endothelial dysfunction in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breat.* 2012; 16(2): 283-94.
12. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Pradhan J, Ference B, Burack RC, et al. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58: 1025–33.
13. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly.* 2006; 136: 745–56.
14. Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference Series). *Pulm Circ.* 2014; 4(2): 169–74.
15. Bremner WF, Holmes EW, Kanabrocki EL, Hermida RC, Ayala D, Garbincius J, et al. Circadian rhythm of serum total homocysteine in men. *Am. J. Cardiol.* 2000; 86: 1153-6.
16. Xiao Y, Zhang Y, Lv X, Su D, Li D, Xia M, et al. Relationship between lipid profile and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects. *Lipid Health Dis.* 2011; 10: 137.
17. Pang X, Liu J, Zhao J, Mao J, Zhang X, Feng L, et al. Homocysteine induces the expression of C - reactive protein via NMDAR-ROS-MAPK-NF- B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2014; 236: 73–81.
18. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol.* 2004; 93: 439–53.
19. Girelli D, Martinelli N, Olivieri O, Pizzolo F, Friso S, Faccini G, et al. (2006) Hyperhomocysteinemia and mortality after coronary artery bypass grafting. *PLoS One* 1:e83.
20. Zhou YH, Tang JY, Wu MJ, Lu J, Wei X, Qin YY, et al. Effect of folic acid supplementation on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta analysis. *PLoS One* 2011; 6:e25142.
21. Ford AH, Garrido GJ, Beer C, Lautenschlager NT, Arnolda L, Flicker L, et al. Homocysteine, grey matter and cognitive function in adults with cardiovascular disease. *PLoS One* 2012; 7:e33345.

22. Okura T, Miyoshi K, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Kukida M, et al. Hyperhomocysteinemia is one of the risk factors associated with cerebrovascular stiffness in hypertensive patients, especially elderly males. *Naturecom Sci Rep*. 2014; 4: 5663.
23. Shenov V, Mehendale V, Prabhu K, Shetty R, Rao P. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of coronary artery disease. *Ind J Clin Biochem*. 2014; 29(3): 339–44.
24. Baszczuk A, Kopczynski Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease [Abstract]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014; 68: 579-89.
25. Zhang S, Yong-Yi B, Luo LM, Xiao WK, Wu HM, Ye P. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. *J Geriatr Cardiol*. 2014; 11: 32–38.
26. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1646–54.
27. Lavie L, Perelman A, Lavie P. Plasma homocysteine levels in obstructive sleep apnea – association with cardiovascular morbidity. *Chest*. 2001; 120: 900–8.
28. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome: an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003; 7: 35–51.
29. Svatikova A, Wolk R, Magera MJ, Shamsuzzaman AS, Phillips BG, Somers VK. Plasma homocystein in obstructive sleep apnea. *Eur Heart J*. 2004; 25, 1325-9.
30. Ersoy EO, Firat H, Akaydin S, Özkan Y, Durusu M, Yüce GD, et al. Association of obstructive sleep apnea with homocystein, nitric oxide and total antioxidant capacity levels in patients with or without coronary artery disease. *Tuberk Toraks*. 2014; 62(3):207-14.
31. Can M, Açıkgöz S, Mungan G, Bayraktaro lu T, Koçak E, Güven B, et al. Serum cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest*. 2006; 129: 233–7.
32. Kokturk O, Ciftci TU, Mollarecep E, Ciftci B. Serum homocysteine levels and cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea syndrome. *Resp Med*. 2006; 100: 536–41.
33. Jordan W, Berger C, Cohrs S, Rodenbeck A, Mayer G, Niedmann PD, et al. CPAP-therapy effectively lowers serum homocysteine in obstructive sleep apnea syndrome. *J Neural Transm*. 2004; 111(6): 683-9.
34. Robinson GV, Pepperell JCT, Segal HC, Davies RJO, Stradling JR. Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials. *Thorax*. 2004; 59 (9):777–82.
35. Barceló A, Barbé F, de la Peña M, Vila M, Pérez G, Piérola J, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J*. 2006; 27: 756-60.
36. Ryan S, Nolan GM, Hannigan E, Cunningham S, Taylor C, McNicholas WT. Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax*. 2007; 62(6): 509-14.

37. Dal-Fabbro C, Garbuio S, D'Almeida V, Cintra F, Tufik S, Bittencourt L. Mandibular advancement device and CPAP upon cardiovascular parameters in OSA. *Sleep and Breath*. 2014; 18 (4), 749-59.
38. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012; 8(5): 597-619.
39. Qaseem A, Holty J-E, Owens D, Dallas P, Starkey M, Shekelle P. The Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Management of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2013; 159: 471-83.
40. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diab Care*. 2004; 27: 1487–95.
41. Weaver TE, Sawyer AM. Adherence to continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnea: implications for future interventions. *Indian J Med Res*. 2010;131; 245-58.
42. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, D et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr*. 2001; 73: 61–7.
43. De Pergola G, Pannacciulli N, Zamboni M, Minenna A, Brocco G, Sciaraffia M, et al. Homocysteine plasma levels are independently associated with insulin resistance in normal weight, overweight and obese pre-menopausal women. *Diabetes Nutr. Metab*. 2001; 14: 253–8.
44. Sanchez-Margalet V, Valle M, Ruz FJ, Gascon F, Mateo J, Goberna R. Elevated plasma total homocysteine levels in hyperinsulinemic obese subjects. *J. Nutr. Biochem*. 2002; 13: 75–9.
45. Konuko lu D, Serin O, Ercan M, Turhan MS. Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. *Clin. Biochem*. 2003; 36: 405–8.
46. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann. Intern. Med*. 2003; 138: 891–7.
47. Sobczak A, Wardas W, Zielinska-Danch W, Pawlicki K. The influence of smoking on plasma homocysteine and cysteine levels in passive and active smokers. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42: 408–14.
48. Slater G, Pengo M, Kosky C, Steier J. Obesity as an independent predictor of subjective excessive daytime sleepiness. *Respir Med*. 2013; 107 (2): 305–9.
49. Niu X, Chen X, Xiao Y, Dong J, Zhang R, Lu M, et al. The Differences in Homocysteine Level between Obstructive Sleep Apnea Patients and Controls: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95794.

50. Chen M, Wu B, Ye X, Zhou Z, Yue X, Wang W, et al. Association between plasma homocysteine levels and obstructive sleep apnoea in patients with ischaemic stroke. *J Clin Neurosci*. 2011; 18: 1454–7.
51. Sales LV, Bruin VM, D'Almeida V, Pompéia S, Bueno OF, Tufik S, et al. Cognition and biomarkers of oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013; 68(4):449-55.
52. Chen X, Niu X, Xiao Y, Dong J, Zhang R, Lu M, et al. Effect of continuous positive airway pressure on homocysteine levels in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath*. 2014; 18(4): 687-94.
53. Toyama Y, Chin K, Chihara Y, Takegami M, Takahashi K, Sumi K, et al. Association between sleep apnea, sleep duration, and serum lipid profile in an urban, male, working population in Japan. *Chest*. 2013; 143(3): 720-8.
54. Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest*. 2015; 147: 266–74.
55. Qian Y, Yi H, Zou J, Meng L, Tang X, Zhu H, et al. Independent Association between Sleep Fragmentation and Dyslipidemia in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Scientific Reports*. 2016, 6: 26089.
56. Graham I, Cooney MT, Bradley D, Dudina A, Reiner Z. Dyslipidemias in the prevention of cardiovascular disease: risks and causality. *Curr Cardiol Rep* 2012; 14(6):709–20.
57. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2011.
58. Nathan DM, Davidson MB, De Fronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, et al. American Diabetes Association. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diab Care*. 2007; 30: 753–9.
59. De Fronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol*. 2011; 108(3 Suppl): 3B–24B.
60. Wang X, Bi Y, Zhang Q, Pan F. Obstructive sleep apnoea and the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Respirology*. 2013; 18: 140–6.
61. Kent BD, Grote L, Ryan S, Pépin JL, Bonsignore MR, Tkacova R, et al. Diabetes Mellitus Prevalence and Control in Sleep-Disordered Breathing: The European Sleep Apnea Cohort (ESADA) Study. *Chest*. 2014; 146: 982-90.



62. Borel AL, Monneret D, Tamisier R, Baguet JP, Faure P, Levy P, et al. The severity of nocturnal hypoxia but not abdominal adiposity is associated with insulin resistance in non-obese men with sleep apnea. *PLoS One*. 2013; 8: e71000.
63. Briandon-Marjollet A, Weiszenstein M, Henri M, Thomas A, Godin-Ribuot D, Polak J. The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetology & Metabolic Syndd*. 2015; 7: 25.
64. Steiropoulos P, Papanas N, Nena E, Tsara V, Filiti C, Tzouvelekis A, et al. Markers of glycemic control and insulin resistance in non-diabetic patients with Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome: does adherence to CPAP treatment improve glycemic control? *Sleep Med*. 2009; 10(8): 887–91.
65. Weinstock TG, Wang X, Rueschman M, Ismail-Beigi F, Aylor J, Babineau DC, et al. A controlled trial of CPAP therapy on metabolic control in individuals with impaired glucose tolerance and sleep apnea. *Sleep*. 2012; 35(5):617-25B.
66. Hecht L, Mohler R, Meyer G. Effects of CPAP-respiration on markers of glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnoea syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ger Med Sci*. 2011; 9: Doc20.
67. Pamidi S, Wroblewski K, Stepien M, Sharif-Sidi K, Kilkus J, Whitmore H, et al. Eight hours of nightly continuous positive airway pressure treatment of obstructive sleep apnea improves glucose metabolism in patients with prediabetes. A randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 192: 96–105.
68. Iftikhar IH, Khan MF, Das A, Magalang UJ. Meta-analysis: continuous positive airway pressure improves insulin resistance in patients with sleep apnea without diabetes. *Ann Am Thorac Soc*. 2013; 10(2):115–20.
69. Yang D, Liu Z, Yang H, Luo Q. Effects of continuous positive airway pressure on glycemic control and insulin resistance in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath*. 2013; 17(1):33–8.
70. Guo LX, Zhao X, Pan Q, Sun X, Li H, Wang XX, et al. Effect of Continuous Positive Airway Pressure Therapy on Glycemic Excursions and Insulin Sensitivity in Patients with Obstructive Sleep Apnea-hypopnea Syndrome and Type 2 Diabetes. *Chinese Med J*. 2015; 128(17): 2301-6.
71. Xu H, Yi H, Guan J, Yin S. Effect of continuous positive airway pressure on lipid profile in patients with obstructive sleep apnea syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 2014, 234 (2): 446 – 53.
72. Lin MT, Lin HH, Lee PL, Weng PH, Lee CC, Lai TC, et al. Beneficial Effect of Continuous Positive Airway Pressure on Lipid Profiles in Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. *Sleep Breath*. 2015; 19.3: 809–17.

73. Cholidou KG, Kostakis ID, Manali ED, Perrea D, Margeli A, Vougas K, et al. Calprotectin: a protein related to cardiovascular risk in adult patients with obstructive sleep apnea. *Cytokine*. 2013; 61: 917-23.
74. Buechner NJ, Zidek W, Eer M, Haske M, Sanner BM. Obstructive sleep apnea syndrome. Effects of therapy on dyslipidemia. *Somnologie* 2001; 5: 97-102.
75. Trzepizur W, Le Vaillant M, Meslier N, Pigeanne T, Masson P, Humeau MP, et al. Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest*. 2013; 143(6): 1584-9.
76. Ip MS, Lam KS, Ho C, Tsang KW, Lam W. Serum leptin and vascular risk factors in obstructive sleep apnea. *Chest*. 2000; 118(3): 580-6.
77. Grassi G, Facchini A, Trevano FQ, Dell'Oro R, Arenare F, Tana F, et al. Obstructive sleep apnea-dependent and-independent adrenergic activation in obesity. *Hypertension*. 2005; 46: 321–5.
78. Pinto P, Bárbara C, Montserrat J, Patarrão R, Guarino M, Carmo M, et al. Effects of CPAP on nitrate and norepinephrine levels in severe and mild-moderate sleep apnea. *BMC Pulm Med*. 2013, 13:13.
79. Phillips C, Yang Q, Williams A, Roth M, Yee B, Hedner J, et al. The effect of short-term withdrawal from continuous positive airway pressure therapy on sympathetic activity and markers of vascular inflammation in subjects with obstructive sleep apnoea. *J of Sleep Research*. 2007; 16: 217–25.
80. Curro M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Lentile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res*. 2014; 39: 1485–95.

Table 1: Initial evaluation of study participants: demographics, comorbidities, polysomnography data, glycemic and lipidic profiles, homocysteine and urinary catecholamines. (BMI: body mass index; EPW: Epworth sleepiness scale; LDL: Low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; HOMA-IR: homeostasis model assessment; OSAS: obstructive sleep apnea syndrome; RDI: respiratory disturbance index; SD: standard deviation; T90: desaturation time under 90%; U: urine)

	TOTAL	Snorers	OSAS	Snorers vs. OSAS	Mild/Mod OSAS	Severe OSAS	Mild/Mod vs. Severe OSAS	Mild/Mod OSAS before PAP	Severe OSAS before PAP	Mild/Mod vs. Severe OSAS before PAP
	N= 103	N= 30	N= 73	(p)	N= 46	N= 27	(p)	N= 22	N= 24	(p)
Age (years) (media/SD)	46/8	45/10	46/8	0.354	46/8	47/7	0.737	47/9	47/7	0.931
Smoking history (n%)	69/67.0	21/70.0	48/65.8	0.681	29/63.0	19/70.4	0.531	14/63.6	17/70.8	0.612
Alcohol consumption (n%)	66/64.1	15/50.0	51/69.9	0.057	30/65.2	21/77.8	0.265	15/68.2	18/75.0	0.617
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) (media/SD)	29.4/3.8	27.4/3.3	30.2/3.7	0.001	28.9/3.0	32.3/3.8	<0.001	29.4/2.4	32.0/3.7	0.006
Cardiac disease (n%)	55/53.4	13/43.3	42/57.5	0.193	23/50.0	19/70.4	0.092	12/54.5	17/70.8	0.263
Respiratory disease (n%)	15/14.6	2/6.7	13/17.8	0.188	7/15.2	6/22.2	0.571	3/13.6	6/25.0	0.382
Dyslipidemia (n%)	49/47.6	4/13.3	45/61.6	<0.001	22/47.8	23/85.2	0.026	10/45.5	20/83.3	0.030
Diabetes (n%)	7/6.8	1/3.3	6/8.2	0.374	2/4.3	4/14.8	0.115	0/0	3/12.5	0.099
EPW scale (media/SD)	9.5/4.8	9.3/5.1	9.5/4.7	0.843	9.7/4.7	9.2/4.8	0.694	11.7/4.1	9.5/5.0	0.103
RDI (events/hour) (media/SD)	20.4/23.3	2.8/1.3	27.6/24.2	<0.001	11.9/6.1	54.3/19.5	<0.001	12.2/6.2	55.0/19.3	<0.001
T90 (%) (media/SD)	5.6/13.2	1.6/8.1	7.2/14.5	0.047	1.0/2.3	17.9/19.6	<0.001	1.2/2.0	16.4/18.2	<0.001
Sleep efficiency (%) (media/SD)	79.2/14.4	77.3/14.4	79.1/14.5	0.407	80.4/14.7	79.1/14.0	0.703	75.2/18.6	77.2/13.8	0.675
Lowest SpO <sub>2</sub> (%) (media/SD)	84.1/7.5	88.5/4.6	82.3/7.7	<0.001	85.3/5.4	77.1/8.3	<0.001	83.3/6.6	77.7/7.8	0.012
ODI (desaturations/hour) (media/SD)	16.8/22.5	2.2/2.9	22.8/24.2	<0.001	8.1/5.7	47.8/23.2	<0.001	8.9/6.0	48.1/23.8	<0.001
Glucose (mg/dL) (media/SD)	101.0/25.8	101.2/31.3	100.9/23.4	0.951	95.9/17.2	109.4/29.8	0.017	97.3/20.2	109.4/31.0	0.128
Glycosylated hemoglobin (%) (media/SD)	5.8/0.8	5.8/1.0	5.8/0.8	0.957	5.6/0.5	6.1/1.0	0.012	5.6/0.7	6.2/1.0	0.036
Insulin (mU/L) (media/SD)	14.7/8.6	12.7/6.8	15.5/9.1	0.124	12.4/6.8	20.9/10.1	<0.001	11.3/5.0	20.8/10.4	<0.001
HOMA-IR (media/SD)	3.8/2.8	3.3/2.8	4.0/2.8	0.241	3.1/2.2	5.7/2.9	<0.001	2.8/1.7	5.6/2.9	<0.001
Total cholesterol (mg/dL) (media/SD)	192.1/37.7	185.9/41.3	194.6/36.1	0.290	194.2/38.4	195.3/32.4	0.092	191.6/42.7	193.7/30.0	0.852
LDL cholesterol (mg/dL) (media/SD)	121.0/31.6	117.2/33.4	122.6/30.9	0.435	122.1/30.6	123.5/32.0	0.854	123.8/32.6	122.0/28.2	0.850
HDL cholesterol (mg/dL) (media/SD)	44.7/10.1	44.7/10.4	44.7/10.0	1.000	46.8/11.3	41.2/6.0	0.019	44.6/12.3	41.0/5.5	0.190
Triglycerides (mg/dL) (media/SD)	134.6/79.3	121.0/68.0	140.2/83.3	0.265	128.8/79.4	159.7/87.6	0.126	120.0/57.1	160.7/88.7	0.074
Homocysteine (μmol/L)	15.2/3.4	14.7/3.3	15.3/3.5	0.399	15.3/3.8	15.3/2.9	0.997	14.9/3.1	15.6/2.6	0.436
Adrenaline (μg/24 h U) (media/SD)	19.9/15.5	17.7/16.3	20.8/54.2	0.765	13.8/12.3	32.7/87.4	0.152	14.2/13.1	34.7/92.6	0.308
Noradrenaline (μg/24 h U) (media/SD)	85.7/180.4	64.6/28.1	94.3/213.4	0.45	63.1/35.5	147.5/345.4	0.103	62.0/35.4	149.7/365.9	0.269
Dopamine (μg/24 h U) (media/SD)	434.6/771.5	373.9/197.0	459.5/908.5	0.611	340.9/202.1	661.5/1465.5	0.147	334.7/220.4	657.2/1550.0	0.339

Table 2: Correlation between variables of polysomnography and glyceric and lipidic profiles, homocysteine and urinary catecholamines. (LDL: Low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; HOMA-IR: homeostasis model assessment; ODI: oxygen desaturation index; RDI: respiratory disturbance index; T90: desaturation time under 90%; U: urine)

	Glucose (mg/dL)		Glycosylated hemoglobin (%)		Insulin (mU/L)		HOMA-IR	
	r	p	r	p	r	p	r	p
RDI (events/hour)	0.217	0.027	0.217	0.028	0.423	<0.001	0.382	<0.001
T90 (%)	0.179	0.071	0.121	0.224	0.342	<0.001	0.331	0.001
Sleep efficiency (%)	0.01	0.923	-0.018	0.857	0.009	0.925	0.061	0.539
Lowest SpO <sub>2</sub> (%)	-0.264	0.007	-0.242	0.014	-0.321	0.001	-0.372	<0.001
ODI (dessaturations/hour)	0.181	0.068	0.172	0.083	0.428	<0.001	0.384	<0.001
	Total cholesterol (mg/dL)		LDL cholesterol (mg/dL)		HDL cholesterol (mg/dL)		Triglycerides (mg/dL)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
RDI (events/hour)	0.087	0.385	0.056	0.577	-0.123	0.215	0.205	0.038
T90 (%)	0.133	0.180	0.111	0.267	-0.021	0.833	0.154	0.122
Sleep efficiency (%)	-0.115	0.246	-0.126	0.206	-0.012	0.908	-0.002	0.986
Lowest SpO <sub>2</sub> (%)	-0.110	0.269	-0.079	0.432	-0.008	0.937	-0.141	0.155
ODI (dessaturations/hour)	0.094	0.343	0.081	0.421	-0.119	0.229	0.175	0.076
	Homocysteine (μmol/L)		Adrenaline (μg/24 h U)		Noradrenaline (μg/24 h U)		Dopamine (μg/24 h U)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
RDI (events/hour)	0.028	0.782	0.083	0.407	0.107	0.284	0.08	0.42
T90 (%)	-0.083	0.405	-0.045	0.651	0.028	0.78	0.001	0.99
Sleep efficiency (%)	-0.135	0.176	-0.095	0.342	-0.052	0.61	-0.033	0.744
Lowest SpO <sub>2</sub> (%)	0.001	0.992	0.029	0.773	-0.044	0.659	-0.013	0.899
ODI (dessaturations/hour)	0.056	0.577	0.024	0.81	0.053	0.592	0.029	0.77

Table 3: OSAS, Mild/moderate and severe OSAS patients: comparative analysis in terms of glyceric and lipidic profiles, homocysteine and urinary catecholamines, before and after PAP therapy. (LDL: Low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; HOMA-IR: homeostasis model assessment; OSAS: obstructive sleep apnea syndrome; PAP: positive airway pressure; U: urine)

	OSAS				Mild/Moderate OSAS				Severe OSAS			
	n	Pre PAP	Post PAP	p	n	Pre PAP	Post PAP	p	n	Pre PAP	Post PAP	p
Glucose (mg/dL)	46	103.6/26.8	99.24/22.2	0.030	22	97.3/20.2	96.6/21.7	0.695	24	109.4/31.0	101.6/22.9	0.027
Glycosylated hemoglobin (%)	46	5.9/0.9	5.9/1.0	0.914	22	5.6/0.7	5.7/0.8	0.125	24	6.2/1.0	6.1/1.1	0.584
Insulin (mU/L)	46	16.3/9.5	20.9/23.1	0.169	22	11.3/5.0	12.1/5.9	0.316	24	20.8/10.4	28.9/29.6	0.206
HOMA-IR	43	4.4/2.8	5.4/6.2	0.294	20	2.9/1.8	3.0/2.0	0.762	23	5.6/2.9	7.4/7.8	0.311
Total cholesterol (mg/dL)	46	192.7/36.2	184.2/29.5	0.043	22	191.6/42.7	184.0/28.4	0.254	24	193.7/29.9	184.3/31.0	0.087
LDL cholesterol (mg/dL)	45	122.9/30.1	108.6/32.6	0.003	22	123.8/32.6	114.6/25.3	0.066	23	122.0/28.2	102.9/37.9	0.017
HDL cholesterol (mg/dL)	46	42.7/9.4	43.3/8.6	0.657	22	44.6/12.3	45.9/10.0	0.598	24	41.0/5.5	40.9/6.4	0.937
Triglycerides (mg/dL)	46	141.2/77.2	137.4/76.0	0.736	22	120.0/57.1	118.3/47.1	0.861	24	160.7/88.7	154.9/92.8	0.775
Homocysteine (μmol/L)	46	15.3/2.8	13.2/2.6	0.005	22	14.9/3.1	16.0/2.5	0.039	24	15.6/2.6	16.5/2.7	0.065
Adrenaline (μg/24 h U)	46	24.9/67.6	18.4/11.5	0.53	22	14.2/13.1	16.9/6.8	0.386	24	34.7/92.6	19.8/14.5	0.451
Noradrenaline (μg/24 h U)	46	107.8/266.4	54.3/22.0	0.182	22	62.0/35.4	51.3/17.4	0.212	24	149.7/365.9	56.9/25.6	0.229
Dopamine (μg/24 h U)	46	503.0/1130.1	311.8/132.0	0.26	22	334.7/220.4	298.8/122.0	0.453	24	657.2/1550.0	323.8/142.2	0.307

**Estudo 2 – Avaliação hematológica em homens com apneia obstrutiva do sono antes e após tratamento por pressão aérea positiva**

*Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure*

(A Feliciano *et al.* Rev Port Pneumol. 2017; 23(2): 71-78)



revista portuguesa de  
**PNEUMOLOGIA**  
portuguese journal of pulmonology

[www.revportpneumol.org](http://www.revportpneumol.org)



## ORIGINAL ARTICLE

## Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after positive airway pressure



A. Feliciano<sup>a,b,\*</sup>, R. Linhas<sup>c</sup>, R. Marçôa<sup>c</sup>, A. Cysneiros<sup>a</sup>, C. Martinho<sup>d</sup>, R.P. Reis<sup>e,b</sup>,  
D. Penque<sup>f</sup>, P. Pinto<sup>g,h,i</sup>, C. Bárbara<sup>d,h,i</sup>

<sup>a</sup> Pneumology in Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>c</sup> Pneumology in Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, Vila Nova de Gaia, Portugal

<sup>d</sup> Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

<sup>e</sup> Cardiology Unit in Hospital Pulido Valente, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

<sup>f</sup> Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

<sup>g</sup> Sleep and Non Invasive Ventilation Unit in Thorax Department, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

<sup>h</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>i</sup> ISAMB-Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Received 17 July 2016; accepted 27 December 2016

Available online 31 January 2017

### KEYWORDS

RDW;  
MPV;  
PDW;  
Red cell parameters;  
Platelet parameters;  
OSAS;  
PAP

**Abstract** Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a systemic inflammatory disease associated with cardiovascular consequences. Red blood cell distribution width (RDW), mean platelet volume (MPV), and platelet distribution width (PDW) are recognized biomarkers of cardiovascular morbidity/mortality. Limited data is available on the association between these parameters and OSAS severity and the relationship with positive airway pressure therapy (PAP). In this prospective study of male OSAS patients we analyzed hematological data in order to evaluate their value in predicting OSAS severity, the relationship with sleep parameters, and their behavior under PAP. Seventy-three patients were included (mean age 46.5 years), of which 36 were mild (49.3%), 10 moderate (13.7%), and 27 severe (37%). The mean RDW increased significantly with OSAS severity and showed a positive correlation with respiratory disturbance index and hypoxemic burdens. Additionally, a group of 48 patients (mean age 47.2 years) were submitted to PAP. After six months, red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, and platelet count showed a significant decrease ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0001$ ;  $p = 0.001$ ;  $p < 0.0001$ ; respectively). Concerning OSAS severity, these parameters also significantly decreased in mild patients ( $p = 0.003$ ;  $p = 0.043$ ;  $p = 0.020$ ;  $p = 0.014$ ; respectively) but only hemoglobin, hematocrit, and platelet count decreased in severe cases ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.008$ ;  $p = 0.018$ ; respectively). This study

\* Corresponding author.

E-mail address: [amelia.feliciano@chln.min-saude.pt](mailto:amelia.feliciano@chln.min-saude.pt) (A. Feliciano).



demonstrated an association between RDW values and OSAS severity. Moreover, red cell and platelet parameters changed significantly after PAP, supporting its cardiovascular protective effect. RDW may become a simple/inexpensive blood biomarker, making it useful in prioritizing OSAS patients waiting for polysomnography, and red cell and platelet parameters could be useful in PAP follow up.

© 2017 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by recurrent obstructive events and intermittent hypoxia, which in turn contributes to the systemic inflammation that underlies this disease and its consequences.<sup>1–3</sup> In concrete terms, the inflammation leads to endothelial dysfunction, which contributes to the pathogenesis of cardiovascular complications in OSAS, in addition to the exposure to risk factors, such as male gender, older age, obesity, and lack of exercise.<sup>4</sup>

Some red blood cells (RBC) and platelets indices have emerged as inflammatory biomarkers in various diseases, namely chronic obstructive pulmonary disease.<sup>5</sup> RBC distribution width (RDW) is a laboratory measure of size variability and respective heterogeneity of circulating erythrocytes. This parameter is calculated by division of standard deviation of RBC volume by mean corpuscular volume (MCV)<sup>6</sup> and is widely used to identify potential causes of anemia. In addition, increased RDW contributes to platelet activation. It may affect the outcomes in chronically ill patients as a strong predictor of all-cause mortality in population cohorts.<sup>7,8</sup> Hematocrit is expressed as the percent of a blood sample occupied by intact RBC, playing an important role in blood coagulability as it affects blood viscosity and platelet aggregation. Platelet size, as measured by mean platelet volume (MPV), is the best known of the platelet indices and has been a marker of platelet activity and aggregation. Increased MPV may reflect either increased platelet activation or increased numbers of large, hyper-aggregated platelets,<sup>9</sup> and may represent a link between hypercoagulability and inflammation.<sup>10</sup> Another marker of platelet activation is the platelet distribution width (PDW)<sup>11</sup> and is derived from direct flow cytometric measurements of platelet cell volume.

To understand OSAS pathophysiology better, a number of studies have recently appeared evaluating the behavior of hematological parameters, specifically RDW, MPV, and PDW, in this disease. However the information on the association between red cell<sup>12–16</sup> and platelets<sup>12,15,17–21</sup> indices and OSAS severity is controversial. Therefore, the aim of this study was to investigate the hematological parameters in OSAS, to assess their correlation with the disease severity, and their response to PAP therapy.

## Material and methods

This prospective study consisted of 103 consecutive male subjects with suspected OSAS, who were evaluated through interviews at a Sleep Clinic.

Exclusion criteria were female gender (to avoid hormonal influence), other sleep disorders, chronic disorders such as anemia, polycythemia, other hematological diseases, hepatic, kidney, and neuromuscular disease. Also excluded were patients with heart failure, neoplasia, acute disease, hypoxemia, and previous PAP treatment.

Demographic and clinical data were collected in all selected patients. Additionally, these patients underwent an overnight polysomnography (PSG) study using Embla S7000 System (Embla; USA) with continuous sleep-technician monitoring. Sleep recordings and events were analyzed manually according to standard criteria.<sup>22</sup> The respiratory disturbance index (RDI), oxygen desaturation index (ODI), percentage of time with saturation under 90% (T90) and lowest oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) were calculated.

Based on the RDI  $\geq 5$  events/hour, patients were diagnosed as OSAS ( $n = 73$ ) and grouped into mild (RDI 5–14.9), moderate (RDI 15–29.9), and severe (RDI  $\geq 30$ ). Further, in pretreatment analysis of 73 patients, moderate and severe groups were combined (RDI  $\geq 15$ ).

After diagnosis, PAP therapy with automatic devices (S9, Resmed, Australia) was prescribed for 48 patients according to clinical and polysomnographic criteria,<sup>23</sup> in severe disease or in disease of any severity when associated with excessive diurnal sleepiness and/or cardio/cerebrovascular complications. Further, in pre/post treatment analysis of 48 patients, moderate and severe groups were combined (RDI  $\geq 15$ ).

Venous blood samples were collected during the morning after PSG (between 7:30 am and 09:00 am) and a 12 h fasting, into EDTA-coated polypropylene tubes. From patients who had undergone PAP treatment, and were free of any acute disease, a second morning blood sample was collected after six months under the same conditions as above described. In all samples, the collected blood was processed between one and two hours in the same equipment (ADVIA 2120i – Siemens). From routine complete hemogram, RBC count, hemoglobin, hematocrit, MCV, RDW, platelets count, MPV, and PDW were determined.

At six months, patients under PAP were evaluated for compliance based on PAP software data. More than 4 h use/night for at least five days/week was accepted as compliance, as described previously.<sup>24</sup>

The study protocol was approved by the local ethics committees and all patients gave written informed consent.

Statistical analyses were performed using SPSS for windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All variables were tested for normality of the distribution using Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables with normal distributions were expressed as mean  $\pm$  standard deviation



**Table 1** Clinical and hematological data of OSAS patients before treatment.

	Total (N = 73)	Mild OSAS (N = 36)	Moderate OSAS (N = 10)	Severe OSAS (N = 27)	Mild vs. moderate-severe (p)
Age (years) [mean (SD)]	46.5 (7.7)	47.3 (8.2)	42.5 (7.7)	47 (7)	0.289
Active smoking habits [n (%)]	16 (22.2)	6 (16.7)	3 (33.3)	7 (25.9)	0.398
Pack years [mean (SD)]	21.5 (31.8)	30 (22.3)	20 (-) <sup>a</sup>	20 (35)	0.177
Cardiac disease [n (%)]	39 (53.4)	18 (50)	2 (20)	19 (70.4)	0.563
Respiratory disease [n (%)]	17 (23.3)	8 (22.2)	3 (30)	6 (22.2)	0.832
Diabetes [n (%)]	11 (15.1)	4 (11.1)	1 (10)	6 (22.2)	0.351
Dyslipidemia [n (%)]	54 (74)	25 (69.4)	6 (60)	23 (85.2)	0.384
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) [median (IQR)]	30.3 (4.8)	28.0 (3.2)	28 (4.4)	31.6 (4.4)	0.005
EPW scale [mean (SD)]	9.5 (4.7)	9.2 (4.6)	11.6 (4.6)	9 (5)	0.748
RDI (events/hour) [median (IQR)]	17 (29.3)	8.9 (4)	21.6 (6)	47.3 (34)	<0.0001
T90 (%) [median (IQR)]	0.7 (8)	0.2 (0.7)	0.5 (3.0)	10.8 (28.9)	<0.0001
Sleep efficiency (%) [median (IQR)]	84.5 (17.0)	84 (15)	87 (13)	83 (24)	0.886
ODI (desaturation/h) [median (IQR)]	10.8 (26.3)	6.9 (5.8)	15.3 (10.7)	46.6 (38.7)	<0.0001
Lowest SpO <sub>2</sub> (%) [median (IQR)]	85 (9)	86 (7)	86 (12.5)	79 (12)	<0.0001
Diurnal SpO <sub>2</sub> (%) [median (IQR)]	97 (1)	97 (1)	97 (2)	97 (1)	0.403
RBC count (×10 <sup>12</sup> /L) [mean (SD)]	5.0 (0.4)	5.0 (0.3)	5.0 (0.5)	5.1 (0.4)	0.517
Hemoglobin (g/dL) [mean (SD)]	15.3 (1.1)	15.2 (1.0)	14.7 (1.3)	15.7 (1.1)	0.486
Hematocrit (%) [mean (SD)]	45.0 (3.2)	45.0 (2.9)	43.2 (3.7)	45.8 (3.3)	0.895
MCV (fL) [mean (SD)]	89.4 (4.1)	89.8 (3.9)	87 (3.3)	89.7 (4.5)	0.414
RDW (%) [mean (SD)]	13.4 (0.7)	13.2 (0.6)	13.5 (0.7)	13.5 (0.8)	0.029
Platelet count (×10 <sup>9</sup> /L) [mean (SD)]	231.6 (57.4)	229.2 (51.7)	226.2 (37.4)	236.8 (70.7)	0.726
MPV (fL) [median (IQR)]	8.8 (1.3)	8.6 (1.2)	8.7 (1.1)	9.2 (1.6)	0.302
PDW (%) [mean (SD)]	49.0 (7.5)	48.4 (9.0)	48.7 (3.8)	51.2 (9.7)	0.074

BMI: body mass index; RDI: respiratory disturbance index; T90: % of time with saturation under 90%; SpO<sub>2</sub>: oxygen saturation; ODI: oxygen desaturation index; RBC: red blood cell count; MCV: mean corpuscular volume; RDW: red blood cell distribution width (RDW). MPV: mean platelet volume; PDW: platelet distribution width.

<sup>a</sup> Impossible to calculate the mean (only one smoking patient).

(SD). Continuous variables with non-normal distributions were summarized as medians (interquartile rang, IQR). Categorical variables were expressed as numbers (percentages). Spearman analysis was performed for correlations between nonparametric variables. Pearson's analysis was performed for correlations between parametric variables. Student *t*-test was used for comparisons between independent groups for the values that were normally distributed and Mann-Whitney *U*-test for comparisons between values not normally distributed. Paired *t*-test was used when comparing mean values before and after PAP treatment. Categorical variables were compared using  $\chi^2$  test. To compare variables not normally distributed before and after PAP treatment, such as MPV and PDW, the Wilcoxon test was used. Results were considered statistically significant when *p* value was <0.05.

## Results

### Hematological evaluation in OSAS before treatment

Clinical and hematological parameters of OSAS patients are shown in Table 1. A total of 73 male patients with OSAS were included, where 36 were mild (49.3%), 10 were moderate (13.7%), and 27 were severe (37%). There were not statistically significant differences between mild and

**Table 2** Correlation analysis between RDW and sleep parameters.

	Spearman correlation coefficient (rs)	<i>p</i>
RDI (events/h)	0.248	0.034
Lowest SpO <sub>2</sub> (%)	-0.261	0.025
T90 (%)	0.292	0.012
ODI (desaturation/h)	0.338	0.003

RDI: respiratory disturbance index; SpO<sub>2</sub>: oxygen saturation; T90: desaturation time under 90%; ODI: oxygen desaturation index.

moderate-severe groups regarding demographic parameters, medical history and Epworth sleepiness scale score.

Considering hematological parameters, only RDW was statistically higher in moderate-severe OSAS patients compared to mild (*p*=0.029). The mean RDW increased significantly with OSAS severity, the difference between mild and moderate-severe groups being statistically significant (*p*=0.029). In addition, RDW showed a positive mild correlation with RDI, ODI, and T90 and a negative mild correlation with lowest SpO<sub>2</sub> (Table 2), and was more affected by ODI.

**Table 3** Clinical and hematological data of OSAS patients with criteria for PAP therapy (before treatment).

	Total (N = 48)	Mild OSAS (N = 18)	Moderate OSAS (N = 5)	Severe OSAS (N = 25)	Mild vs. moderate-severe OSAS (p)
Age (years) [mean (SD)]	47.2 (7.6)	48 (9)	47 (7)	47 (7)	0.638
Active smoking habits [n (%)]	9 (19.9)	1 (5.6)	2 (50)	6 (24)	0.071
Pack years [mean (SD)]	5 (20)	— <sup>a</sup>	15 (—)	35 (41)	0.065
Cardiac disease [n (%)]	30 (62.5)	11 (61.1)	2 (40)	17 (68)	0.492
Respiratory disease [n (%)]	10 (20.8)	2 (11.1)	2 (40)	6 (24)	0.317
Diabetes [n (%)]	9 (18.8)	3 (16.7)	1 (20)	5 (20)	0.960
Dyslipidemia [n (%)]	34 (70.8)	12 (66.7)	2 (40)	20 (80)	0.176
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) [median (IQR)]	31.1 (4.3)	29.5 (4.7)	29 (4.2)	31.6 (4.1)	0.023
EPW scale [mean (SD)]	10.4 (4.7)	12 (4)	11 (7)	9 (5)	0.078
RDI (events/h) [median (IQR)]	32.9 (42)	9.0 (3)	21.4 (7)	48.7 (35)	<0.0001
T90 (%) [median (IQR)]	1.7 (11.1)	0.3 (0.6)	2.7 (5.5)	10.8 (30.1)	<0.0001
Sleep efficiency (%) [median (IQR)]	80.5 (23.3)	78.2 (23.7)	83.5 (28)	79.7 (23.4)	0.670
ODI (desaturation/h) [median (IQR)]	19.3 (41.5)	7.2 (4)	18.6 (16.8)	49.7 (41.5)	<0.0001
Lowest SpO <sub>2</sub> (%) [median (IQR)]	80.0 (8.2)	86 (6.3)	76 (19)	79 (14.5)	0.001
Diurnal SpO <sub>2</sub> (%) [median (IQR)]	96 (1)	97 (1.1)	98 (3)	97 (2)	0.689
RBC count ( $\times 10^{12}/L$ ) [mean (SD)]	5.1 (0.4)	5.0 (0.3)	5.0 (0.6)	5.1 (0.4)	0.400
Hemoglobin (g/dL) [mean (SD)]	15.4 (1.2)	15.2 (1.0)	14.6 (1.9)	15.7 (1.1)	0.263
Hematocrit (%) [mean (SD)]	45.0 (3.3)	44.5 (2.6)	43.4 (2.1)	45.7 (3.3)	0.233
MCV (fL) [mean (SD)]	88.9 (4.4)	88.6 (4.3)	86.4 (2.1)	89.7 (4.6)	0.749
RDW (%) [mean (SD)]	13.4 (0.7)	13.0 (0.5)	13.6 (0.9)	13.6 (0.7)	0.005
Platelet count ( $\times 10^9/L$ ) [mean (SD)]	232.4 (59.7)	235.6 (75.3)	234.2 (31.3)	229.6 (68.4)	0.537
MPV (fL) [median (IQR)]	9.0 (1.3)	8.6 (1.3)	8.5 (2.6)	9.2 (1.8)	0.594
PDW (%) [mean (SD)]	50.2 (8.2)	49.3 (6.3)	49.8 (5.8)	51.0 (1.0)	0.975

BMI: body mass index; RDI: respiratory disturbance index; T90: desaturation time under 90%; SpO<sub>2</sub>: oxygen saturation; ODI: oxygen desaturation index; RBC: red blood cell count; MCV: mean corpuscular volume; RDW: red blood cell distribution width (RDW). MPV: mean platelet volume; PDW: platelet distribution width.

<sup>a</sup> Impossible to calculate the mean (only one smoking patient).

### Hematological evaluation in OSAS under treatment

Clinical and hematological parameters of OSAS patients under treatment are shown in Table 3. A total of 48 OSAS patients underwent PAP therapy, where 18 were mild (37.5%), 5 were moderate (10.4%), and 25 were severe (52.1%). There were not statistically significant differences between mild and moderate-severe groups regarding demographic parameters, medical history, Epworth sleepiness scale score, and PAP compliance. However, BMI was higher in moderate-severe group compared with mild group ( $p = 0.023$ ).

Considering hematological parameters, there were not statistically significant differences between mild and moderate-severe groups

After six months of compliant PAP treatment (Table 4) the hemogram data, although showing normal reference values, revealed a significant decrease in the RBC count, hemoglobin, hematocrit, and platelet count in all patients ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0001$ ;  $p = 0.001$ ;  $p < 0.0001$ ; respectively). Considering each severity group, these same parameters significantly decreased after PAP treatment in mild patients ( $p = 0.003$ ;  $p = 0.043$ ;  $p = 0.020$ ;  $p = 0.014$ ; respectively) and in severe patients only hemoglobin, hematocrit, and platelet count decrease significantly ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.008$ ;  $p = 0.018$ ; respectively).

In conclusion, concerning hematological evaluation in OSAS patients before PAP therapy, only RDW showed statistical increase according to OSAS severity. However, after six months of PAP therapy RDW values had not changed, which may be due to a small sample size.

### Discussion

This study reinforces the importance of hematological evaluation as an easy complementary tool to the global approach to OSAS patients by showing that RDW increased significantly with OSAS severity and that red cell count, hemoglobin, hematocrit, and platelet count mean values significantly decreased after PAP treatment. These findings suggest that RDW might be used as marker of OSAS severity and RBC and platelets count, hemoglobin, and hematocrit used as markers of response to treatment. In this study, the possible confounding effects of several factors/diseases on the studied parameters were excluded, such as age, smoking habits, and comorbidities since there were no statistical differences regarding these factors between different OSAS severity levels, and neither group showed the presence of anemia.



Table 4 Hematological data of OSAS patients before and after treatment.

	Total (N=48)			Mild OSAS (N=18)			Moderate OSAS (N=5)			Severe OSAS (N=25)		
	Pre-PAP	Post-PAP	p	Pre-PAP	Post-PAP	p	Pre-PAP	Post-PAP	p	Pre-PAP	Post-PAP	p
RBC Count ( $\times 10^{12}/L$ ) [mean (SD)]	5.1 (0.4)	4.9 (0.3)	<0.0001	5.0 (0.3)	4.9 (0.3)	0.003	5.0 (0.6)	5.0 (0.42)	0.684	5.1 (0.4)	5.0 (0.3)	0.005
Hemoglobin (g/dL) [mean (SD)]	15.4 (1.2)	14.9 (1.0)	<0.0001	15.2 (1.0)	14.9 (0.9)	0.043	14.6 (1.9)	14.6 (1.5)	0.908	15.7 (1.1)	15.0 (1.0)	<0.0001
Hematocrit (%) [mean (SD)]	45.0 (0.3)	43.9 (3.0)	0.001	44.5 (2.6)	43.2 (3.0)	0.020	43.4 (5.2)	43.5 (4.1)	0.981	45.7 (3.3)	44.5 (2.9)	0.008
MCV (fL) [mean (SD)]	88.9 (4.4)	88.9 (3.8)	0.908	88.6 (4.3)	88.8 (3.7)	0.780	86.4 (2.1)	86.8 (1.2)	0.339	89.7 (4.6)	89.5 (4.2)	0.674
RDW (%) [mean (SD)]	13.4 (0.7)	13.6 (0.8)	0.070	13.1 (0.5)	13.6 (0.9)	0.059	13.6 (0.9)	13.9 (1.2)	0.621	13.6 (0.7)	13.7 (0.7)	0.711
Platelet Count ( $\times 10^9/L$ ) [mean (SD)]	232.4 (59.7)	212.0 (51.6)	<0.0001	235.6 (75.3)	217.6 (52.9)	0.014	234.2 (31.3)	201.6 (28.0)	0.097	229.6 (68.4)	210.0 (55.2)	0.018
MPV (fL) [median (IQR)]	9.0 (1.2)	9.0 (1.7)	0.900	8.6 (1.3)	8.7 (1.2)	0.736	8.7 (1.1)	9.2 (1.2)	0.242	9.2 (1.2)	9.0 (2.3)	0.737
PDW (%) [mean (SD)]	50.2 (8.5)	49.5 (15.3)	0.781	49.3 (62.5)	51.4 (9.4)	0.287	49.6 (2.9)	51.4 (10.1)	0.631	51.0 (10.0)	49.5 (17.1)	0.727
PAP compliance (h) [mean (SD)]	-	4.7 (1.9)	-	-	4.3 (1.4)	-	-	6.1 (1.8)	-	-	4.9 (2.3)	-

RBC: red blood cell count; MCV: mean corpuscular volume; RDW: red blood cell distribution width (RDW). MPV: mean platelet volume; PDW: platelet distribution width.

### Hematological evaluation in OSAS before treatment

There has not been consensus in previous studies in literature about RDW expression in OSAS. Some authors showed that RDW values were higher in OSAS patients than in controls<sup>13,14</sup> and also higher in those with cardiovascular diseases.<sup>13</sup> While others reported that RDW mean values were similar in OSAS patients compared to snorers.<sup>16</sup>

Considering these facts, we intended to evaluate the expression of RDW according to OSAS severity and in our study RDW increased significantly with severity of OSAS. Additionally, RDW showed a positive correlation with RDI and hypoxemic burdens (ODI, T90 and lowest SpO<sub>2</sub>). The exact mechanism of these results is not clear; however, this may be related to the existence of chronic inflammation. In fact, chronic inflammation promotes red blood cell membrane deformability and changes in erythropoiesis, thus increasing RDW.<sup>25</sup>

Moreover, the fact that RDW was also associated with hypoxemic burdens could be explained by the effect of hypoxia. In OSAS, sustained hypoxia, leads to activation of hypoxia inducible factor 1 resulting in increased erythropoietin expression<sup>26</sup> and consequently higher RDW. These results, taken altogether, support our proposed role of RDW as a simple surrogate marker for OSAS severity.

A previous study, which compared controls with OSAS patients, reported a significant correlation between RDW and the apnea-hypopnea index (AHI), age, and mean SpO<sub>2</sub>.<sup>13</sup> Also, the study of Sökücü and co-workers found that RDW was higher in patients with OSAS and increased significantly with severity, even after correction for anemia.<sup>14</sup> Recently, Gunbatar and coworkers showed that RDW in OSAS patients was similar compared to snorers. They, also, reported that BMI, AHI, pulmonary artery pressure, and T90 were positively correlated with RDW in patients with OSAS.<sup>16</sup> However, age and BMI were different between patients and controls, which could be confounding factors. Another recent study reinforced the idea that RDW could be a marker for OSAS severity<sup>27</sup> because it was positively correlated with AHI, ODI, Epworth sleepiness scale, hematocrit and negatively correlated with minimum SpO<sub>2</sub> and rapid eye movement sleep. However, in this multi-variable analysis, only ODI was an independent predictor of RDW, which means a higher ODI will predict a higher RDW.

Additionally, in our study other hematological parameters did not significantly change with OSAS severity. In literature there are controversial results about the expression of these parameters in OSAS.<sup>16–19</sup> Some authors have reported that the hematocrit, platelet count, MPV, and PDW increased in OSAS and correlated positively with severity,<sup>27</sup> even after controlling for possible confounding factors. However, OSAS patients usually do not show clinical polycythemia.<sup>28</sup> Our results, concerning the PDW and MPV tendency to increase with OSAS severity, could be explained by increased platelet activation and aggregation.<sup>29,30</sup> In fact, MPV is an indicator of platelet activation which could result from sympathetic overactivity,<sup>31</sup> hypoxia,<sup>32</sup> and inflammation,<sup>33,34</sup> all being well-known features of OSAS.<sup>2,3,35</sup> Additionally, platelet activation may contribute to the increased incidence of cardiovascular events in patients with OSAS.<sup>36,19</sup>

### Hematological evaluation in OSAS under treatment

After six month of PAP treatment, patients showed a significant decrease in RBC count, hemoglobin, hematocrit, and platelet count. Sustained hypoxia results in increased expression of erythropoietin<sup>26</sup> inducing erythropoiesis with consequent increase in hematological parameters. PAP correction of respiratory events and consequent hypoxia and inflammation can translate in a decrease in RBC and platelets counts, hemoglobin, and hematocrit as obtained in our study. On the other hand, the tendency to decrease MPV and PDW could be also explained by the fact that besides PAP decreasing hypoxia and inflammation, it also improves platelet aggregability.<sup>37</sup>

Our results agree with previous studies that showed decreases in hematocrit after PAP treatment.<sup>38,39</sup> A recent study<sup>20</sup> reported a significant reduction of hematocrit and MPV, while RDW and PDW increased after six months of PAP treatment in patients with severe OSAS.

There are potential limitations of this study, such as the small sample size, exclusion of women, and lack of comparison with a group of OSAS patients under sham PAP. Also, in this study we did not evaluate the correlation of some markers of inflammation, neurohormonal activation, or oxidative stress with these hematological parameters. The lack of exclusion of OSAS patients with hypertension, diabetes or chronic medication such as anti-coagulation, anti-aggregation, anti-inflammation or immunosuppression agents is also an additional limitation. Finally, although our study population was not anemic, we did not measure nutritional status, which could be a potential cause of increased RDW.

### Conclusions

Our study has established the importance of hematological evaluation as complementary tool for diagnosis and treatment response in OSAS patients.

RDW, as a marker of OSAS severity, can be used as an easy/inexpensive tool for triaging OSAS patients in laboratories with long waiting lists. While RBC and platelets count, hemoglobin, and hematocrit could be used as markers of response to treatment, both in primary and secondary care settings.

Further studies, with a bigger sample, inclusion of women (before and after menopause), hematological cut-off points for diagnosis and treatment, are needed.

### Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this study.

**Confidentiality of data.** The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data.

**Right to privacy and informed consent.** The authors have obtained the written informed consent of the patients or



subjects mentioned in the article. The corresponding author is in possession of this document.

## Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## Acknowledgment

To patients that voluntarily collaborated in this study. Project partially supported by Harvard Medical School-Portugal Program (HMSP-ICJ/0022/2011).

## References

- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Thorax*. 2009;64:1–36.
- Zamarrón C, Morete E, del Campo Matias F. Obstructive sleep apnoea syndrome as a systemic low-grade inflammatory disorder. In: Gasparyan A, editor. *Cardiovascular risk factors*. InTech; 2012. ISBN: 978-953-51-0240-3.
- Gileles-Hillel A, Alonso-Álvarez ML, Kheirandish-Goza L, Peris E, Cordero-Guevara JA, Terán-Santos J, et al. Inflammatory markers and obstructive sleep apnea in obese children: the NANOS study. *Mediat Inflamm*. 2014;1–9. Article ID 605280.
- Lorenzi Filho G, Genta PR, Pedrosa RP, Drager LF, Martinez D. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea syndrome. *J Bras Pneumol*. 2010;36 Suppl. 2:38–42.
- Tertemiz K, Ozgen Alpaydin A, Sevinc C, Ellidokuz H, Acara A, Cimrin A. Could “red cell distribution width” predict COPD severity? *Rev Port Pneumol*. 2016;22:196–201.
- Evans TC, Jehle D. The red blood cell distribution width. *J Emerg Med*. 1991;9:71–4.
- Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA. Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Arch Intern Med*. 2009;169:588–94.
- Patel KV, Ferrucci L, Ersler WB, Longo D, Guralnik J. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Arch Intern Med*. 2009;169:515–23.
- Park Y, Schoene N, Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets*. 2002;13:301–6.
- Gasparyan AY, Aivazyan L, Mikhailidis DP, Kitis GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des*. 2011;17:47–58.
- Vagdatli E, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*. 2010;14:28–32.
- Kurt OK, Yildiz N. The importance of laboratory parameters in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Blood Coagul Fibrinol*. 2013;24:371–4.
- Ozsu S, Abul Y, Gulsoy A, Bulbul Y, Yaman S, Ozlu T. Red cell distribution width in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Lung*. 2012;190:319–26.
- Sökücü SN, Karasulu L, Dalar L, Seyhan EC, Altın S. Can red blood cell distribution width predict severity of obstructive sleep apnea syndrome? *J Clin Sleep Med*. 2012;8:521–5.
- Karakas MS, Er A, Gülcan AR, Altekin RE, Yalçinkaya S, Aykut Çilli, et al. Assessment of red cell distribution width (RDW) in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Turgut Ozal Med Center*. 2013;20:208–14.
- Gunbatar H, Sertogullarindan B, Ekin S, Akdag S, Arisoy A, Sayhan H. The correlation between red blood cell distribution width levels with the severity of obstructive sleep apnea and carotid intima media thickness. *Med Sci Monit*. 2014;20:2199–204.
- Varol E, Ozturk O, Gonca T, Has M, Ozaydin M, Erdogan D, et al. A Mean platelet volume is increased in patients with severe obstructive sleep apnea. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010;70:497–502.
- Nena E, Papanas N, Steiropoulos P, Zikidou P, Zarogoulidis P, Pita E, et al. Mean platelet volume and platelet distribution width in non-diabetic subjects with obstructive sleep apnoea syndrome: new indices of severity? *Platelets*. 2012;23:447–54.
- Kanbay A, Tutar N, Kaya E, Buyukoglan H, Ozdogan N, Oymak FS, et al. Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with cardiovascular diseases. *Blood Coagul Fibrinol*. 2013;24:532–6.
- Sökücü D, Özdemir C, Dalar L, Karasulu L, Aydın L, Altın Ş. Complete blood count alterations after six months of continuous positive airway pressure treatment in patients with severe obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2014;10:873–8.
- Akyüz A, Akkoyun DÇ, Oran M, Değirmenci H, Alp R. Mean platelet volume in patients with obstructive sleep apnea and its relationship with simpler heart rate derivatives. *Cardiol Res Pract*. 2014;454701.
- Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012;8:597–619.
- Qaseem A, Holty J-E, Owens D, Dallas P, Starkey M, Shekelle P. The Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Management of obstructive sleep apnea in adults: a clinical practice guideline from the American college of physicians. *Ann Intern Med*. 2013;159:471–83.
- Weaver TE, Sawyer AM. Adherence to continuous positive airway pressure treatment for obstructive sleep apnoea: implications for future interventions. *Indian J Med Res*. 2010;131:245–58.
- Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:628–32.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:343–54.
- Yousef A, Alkhiary W. The severity of obstructive sleep apnea syndrome is related to red cell distribution width and hematocrit values. *J Sleep Disord Ther*. 2015;4:192.
- Choi JB, Lored JS, Norman D, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, et al. Does obstructive sleep apnea increase hematocrit? *Sleep Breath*. 2006;10:155–60.
- Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;178:475–81.
- Kondo Y, Kuwahira I, Shimizu M, Nagai A, Iwamoto T, Kato S, et al. Significant relationship between platelet activation and apnea-hypopnea index in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Tokai J Exp Clin Med*. 2011;36:79–83.
- Geiser T, Buck F, Meyer BJ, Bassetti C, Haeberli A, Gugger M. In vivo platelet activation is increased during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration*. 2002;69:229–34.
- Feres MC, Cintra FD, Rizzi CF, Mello-Fujita L, Lino de Souza AA, Tufik S, et al. Evaluation and validation of a method for determining platelet catecholamine in patients with obstructive sleep apnea and arterial hypertension. *PLOS ONE*. 2014;9:e98407.
- Tyagi T, Ahmad S, Gupta N, Sahu A, Ahmad Y, Nair V, et al. Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. *Blood*. 2014;123:1250–60.

34. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Sci World J*. 2014. ID 781857.
35. Hoyos CM, Melehan KL, Liu PY, Grunstein RR, Phillips CL. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med Rev*. 2015;20C:15–26.
36. Murat S, Duran M, Kalay N, Gunebakmaz O, Akpek M, Doger C, et al. Relation between mean platelet volume and severity of atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes. *Angiology*. 2013;64:131–6.
37. Oga T, Chin K, Tabuchi A, Kawato M, Morimoto T, Takahashi K, et al. Effects of obstructive sleep apnea with intermittent hypoxia on platelet aggregability. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:862–9.
38. Krieger J, Sforza E, Delanoe C, Petiau C. Decrease in haematocrit with continuous positive airway pressure treatment in obstructive sleep apnoea patients. *Eur Respir J*. 1992;5: 228–33.
39. Khan AM, Ashizawa S, Hlebowicz V, Appel DW. Anemia of aging and obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2011;15:29–34.

**Estudo 3 – Alterações noturnas e diurnas no proteoma eritrocitário na apneia obstrutiva do sono**

*Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome*

(A Feliciano *et al.* Data in Brief 11 (2017) 103–110)

**Alterações noturnas e diurnas do estado redox/oligomérico da perorredoxina-2 nos glóbulos vermelhos na apneia obstrutiva do sono: correlação com parâmetros polissonográficos e metabólicos**

*Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameter*

(A Feliciano *et al.* Biochimica et Biophysica Acta 1863 (2017): 621-629)





Contents lists available at ScienceDirect

## Data in Brief

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dib](http://www.elsevier.com/locate/dib)

## Data Article

## Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome



Amélia Feliciano<sup>a,b,1</sup>, Fátima Vaz<sup>b,c,1</sup>,  
Cristina Valentim-Coelho<sup>b</sup>, Vukosava M. Torres<sup>b,c</sup>, Rita Silva<sup>b</sup>,  
Vesna Prosinecki<sup>b</sup>, Bruno M. Alexandre<sup>b</sup>, Andreia Almeida<sup>b</sup>,  
Catarina Almeida-Marques<sup>b</sup>, Ana S. Carvalho<sup>d</sup>,  
Rune Matthiesen<sup>d</sup>, Atul Malhotra<sup>e</sup>, Paula Pinto<sup>a,f</sup>,  
Cristina Bárbara<sup>a,f</sup>, Deborah Penque<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte (CHLN), Lisboa, Portugal<sup>b</sup> Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal<sup>c</sup> ToxOmics- Centre of Toxicogenomics and Human Health, Universidade Nova de Lisboa, Portugal<sup>d</sup> Departamento da Promoção da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal<sup>e</sup> Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine Division, University of California San Diego, CA, USA<sup>f</sup> Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 November 2016

Received in revised form

3 January 2017

Accepted 5 January 2017

Available online 16 January 2017

## Keywords:

Obstructive Sleep Apnea

Red blood cells

2D-DIGE

Biomarkers

## ABSTRACT

This article presents proteomics data referenced in [1] Using proteomics-based evaluation of red blood cells (RBCs), we have identified differentially abundant proteins associated with Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSA). RBCs were collected from peripheral blood of patients with moderate/severe OSA or snoring at pre- (evening) and post-night (morning) polysomnography, so that proteome variations between these time points could be assessed. RBC cytoplasmic fraction depleted of hemoglobin, using Hemovoid™ system, were analyzed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE), the 2D image software-based analyzed and relevant differentially abundant proteins identified by mass spectrometry (MS). MS identified 31 protein spots differentially abundant corresponding to 21 unique proteins

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.019>

\* Corresponding author at: Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal.

E-mail address: [deborah.penque@insa.min-saude.pt](mailto:deborah.penque@insa.min-saude.pt) (D. Penque).<sup>1</sup> Authors collaborated equally to the study.<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.01.005>2352-3409/© 2017 The Author. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



possibly due to the existence of post-translational modification regulations. Functional analysis by bioinformatics tools indicated that most proteins are associated with catalytic, oxidoreductase, peroxidase, hydrolase, ATPase and anti-oxidant activity. At morning a larger numbers of differential proteins including response to chemical stimulus, oxidation reduction, regulation of catalytic activity and response to stress were observed in OSA. The data might support further research in OSA biomarker discovery and validation.

© 2017 The Author. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Specifications Table

Subject area	Biology
More specific subject area	Molecular Medicine; Clinical Proteomics
Type of data	Figures, graphics and tables
How data was acquired	Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE) - based proteomics followed by image analysis with Progenesis SameSpots, version 4.5 software (Nonlinear Dynamics, UK). Protein identification by mass spectrometry (MALDI/TOF/TOF). Pathway analysis by open source DAVID software [2].
Data format	Filtered, analysed
Experimental factors	RBC samples were hemoglobin (Hb) depleted, using Hemovoid™ system, before analysis.
Experimental features	Samples from OSA and Snorers (controls) patients biobank collected at evening and morning time (i.e, before and after night polysomnographic diagnosis) were enrolled.
Data source location	Lisbon, Portugal,
Data accessibility	Data is with this article

### Value of the data

- For the first time (evening/morning) changes in OSA RBC proteome are shown probably induced by nocturnal intermittent hypoxia and sleep disruption experienced by these patients.
- The provided data set may help to get new insights into RBC homeostasis which dysregulation can be a source of oxidative-stress and/or inflammation causally linking OSA to cancer and cardiometabolic disorders.
- These data could be used in further verification/validation assays to selected candidates biomarker of OSA severity and/or treatment response.

### 1. Data

2-D gel reference image of OSA RBC cytoplasmic fraction depleted from hemoglobin was shown. Graphics representing the identified variations for the different PRDX2 and Catalase proteoforms between groups and conditions were highlighted as examples. The 31 proteins spots identified by MALDI/TOF/TOF MS are displayed in detail in the Table. Fold-change histograms and pathway analysis

between patients' groups and conditions were shown. Material and methods are provided in detail as much as possible to be reproduced elsewhere.

## 2. Experimental design, materials and methods

### 2.1. Sample collection and biochemical analysis

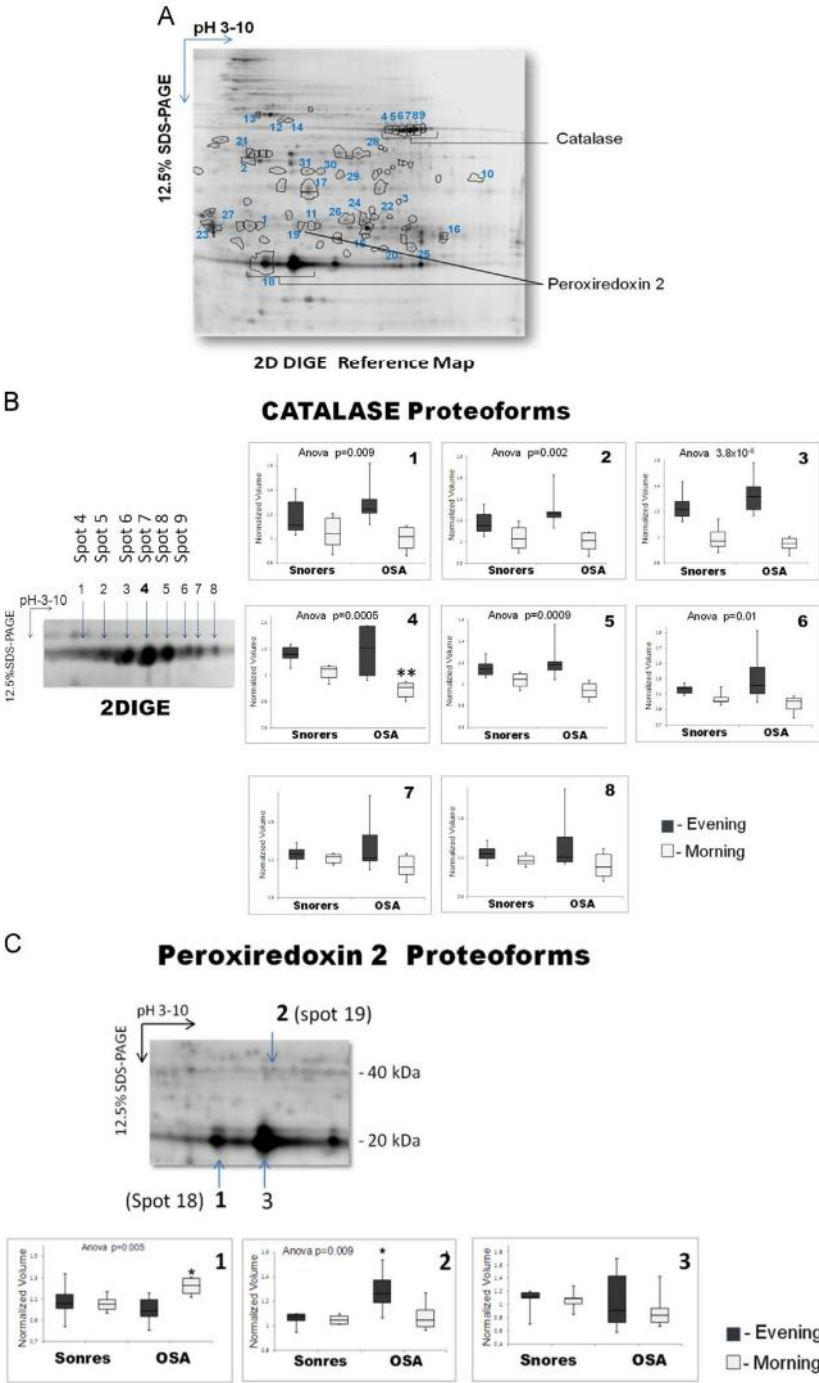
Patients with suspected OSA are hospitalized for an overnight polysomnography (PSG) study. For the proteomics study [1], blood samples were collected into EDTA-coated polypropylene tubes before and after PSG, i.e., between 8:00 pm and 09:30 pm (referred as 'evening') and between 7:30 am and 09:00 am (referred as 'morning'). Samples were kept no longer than 4 h at 4 °C until fractionation by centrifugation. The obtained RBC pellets were aliquoted and stored at –80 °C until analysis.

### 2.2. RBC sample preparation

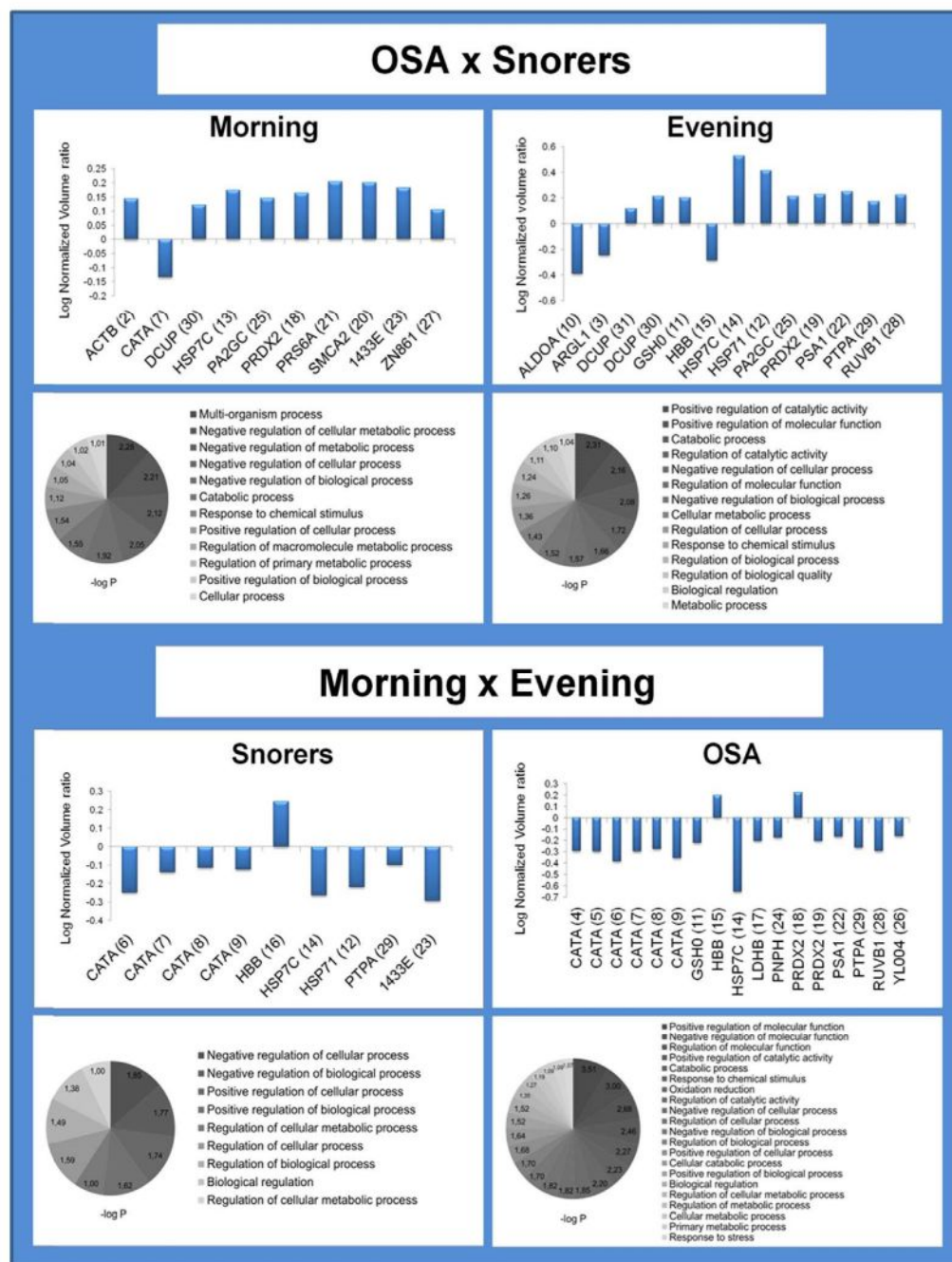
RBC pellet samples were lysated by incubation with (1:20) 5 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 1:100 cocktail of protease inhibitors (P8340, Sigma Aldrich) for 30 min at 4 °C followed sonication 10 s/40 amplitude/pulse mode (Ultrasonic Processor, VibraCell, Sonics & Materials Inc, USA). After centrifugation at 25.000 g for 30 min at 4 °C, the supernatant cytoplasm fractions were recovered for further hemoglobin (Hb) depletion using Hemovoid depletion columns (Biotech Support Group, Monmouth JCT, USA), according to the manufacture's protocol. The obtained Hb depleted fractions were concentrated and buffer-exchanged with 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.4 by centrifugal filtration using 3-kD Molecular Weight Cut-Offs (MWCO) (Amicon Ultra 4, Millipore) spin concentrators. The protein concentration was determined by a colorimetric assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher) according to the manufacturer's protocol. The efficiency of Hb-depletion was confirmed by analysing samples (10  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) on coomassie stained 4–12% SDS-PAGE mini gels (NuPAGE Novex Bis Tris, Invitrogen, USA) (data not shown). Samples were stored at –80 °C until further analysis.

### 2.3. 2D-DIGE

Analysis of Hb-depleted pooled samples ( $n=3/\text{group}$ ) from the four study groups was based on a 2D-DIGE approach, using the CyDye DIGE fluor minimal dyes Cy3 and Cy5 from GE Healthcare. Briefly, 50  $\mu\text{g}$  of each pooled samples (in duplicate) were lyophilized and resuspended in 6.25  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and incubated with 400 pmol Cy5 solution for 30 min at 4 °C in the dark. The labelling reaction was stopped by adding 1  $\mu\text{L}$  of 10 mM lysine and the samples were incubated for another 10 min. A sample of each pool was pooled together and labelled with Cy3 as above described to comprise the internal standard (IS) for each gel. Each Cy5 labelled sample was combined with an equal amount of Cy3 labelled IS sample (50  $\mu\text{g}$ :50  $\mu\text{g}$ ) and mixed with lysis buffer for with a trace of bromophenol blue to 140  $\mu\text{l}$  final volume. To ensure an optimal focusing of the proteins, an ampholyte solution for pH 3–10 NL (Serva, Heidelberg, Germany) was added in a concentration of 1% and the samples were loaded to 24-cm IPG strips with a pH gradient of 3–10NL (GE Healthcare) previously rehydrated for 20 h at RT with 310  $\mu\text{l}$  of lysis buffer. IEF was performed in an Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) in ceramic manifold with cup loading of the sample, and focused as follows: step and hold 100 V for 5 h, gradient 300 V for 2 h, gradient 500 V for 1 h, gradient 1000 V for 2 h, gradient 2000 V for 1 h, gradient 6000 V for 3 h and 8000 V for 2 h, followed by step and hold at 8000 V for 8 h. The maximum current per strip was set to 50  $\mu\text{A}$ . Prior to 2nd dimension stripes were equilibrated once with 8 mL of SDS equilibration buffer (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol (87%), 2% SDS and a trace of bromophenol blue) including 1%



**Fig. 1.** 2D DIGE reference map of Hb-depleted RBC from OSA and Snorers patients collected at evening or morning day time. (A) The 31 protein spots exhibiting significant differences in abundance (fold change  $\geq 1.2$ ; Anova  $p < 0.05$ ) between OSA and Snorers at evening or morning times that were identified by MS, corresponding to 21 unique proteins in consequence of post-translational modification (PTM) regulations are indicated with circles on the 2D gel image. The identity of these proteins is fully described in the Table 1. As an example, catalase proteoforms (B) and peroxiredoxin-2 proteoforms (C) are described in more detail. (B) About 8 proteoforms for catalase were identified. The most acidic ones (spot 4–9 or n°1–6) probably resulting from phosphorylation [4] were shown significantly decreased in OSA morning samples. (C) At least three peroxiredoxin-2 proteoforms were identified. The acidic monomeric forms (spot 18 or n° 1) and dimeric forms (spot 19 or n°2) reported as oxi/overoxidized forms of peroxiredoxin-2 [5] were significantly increased in OSA RBC at morning evening daytime, respectively.



**Fig. 2.** Fold-change histogram and pathway analysis of RBC proteins/proteomeforms with differential abundance in OSA versus Snorers at morning or evening and Morning versus Evening in Snorers or OSA (read from top to down). Proteins/proteomeforms with significant differential abundance from each comparable group/condition were plotted on the histograms, which the log volume ratio of ( ± ) 1.0 represents a 10-fold increase/decrease changes. The most representative biological processes retrieved from DAVID v6.7 [6] are shown on the bottom of each respective histogram.

**Table 1**

Annotation of differential RBC cytosolic proteins between OSA and Snorers at Evening and Morning.

Spot	Protein name	Acession ID	MW/pI	Mascot Score	Sequence Coverage (%)	Anova (p)	Fold (Anova p < 0.05)
1	Actin	ACTB_HUMAN	42052/ 5.29	73	20	0.016	1.4
2	Actin	ACTB_HUMAN	42052/ 5.29	26	2	0.042	1.2
3	Arginine and glutamate-rich protein 1	ARGL1_HUMAN	33197/ 10.35	60	11	0.036	1.5
4	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	663	25	0.009	1.3
5	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	253	7	0.002	1.3
6	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	896	34	3.8E-06	1.4
7	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	730	31	4.9E-04	1.3
8	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	797	29	0.001	1.3
9	Catalase	CATA_HUMAN	59719/ 6.90	397	21	0.012	1.4
10	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	39851/ 8.30	76	24	0.034	1.8
11	Glutamate–cysteine ligase regulatory subunit	GSH0_HUMAN	30708/ 5.69	235	26	0.020	1.2
12	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	70294/ 5.48	201	29	0.007	1.8
13	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	70854/ 5.37	52	2	0.019	1.2
14	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMAN	70854/ 5.37	380	23	3.8E-04	2.1
15	Hemoglobin subunit beta	HBB_HUMAN	16102/ 6.75	142	63	0.005	1.3
16	Hemoglobin subunit beta	HBB_HUMAN	16102/ 6.75	61	8	0.024	1.4
17	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN	36615/ 5.72	412	32	0.003	1.3
18	Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	22049/ 5.66	857	64	0.031	1.2
19	Peroxiredoxin-2	PRDX2_HUMAN	22049/ 5.66	85	29	0.004	1.2
20	Probable global transcription activator SNF2L2	SMCA2_HUMAN	181166/ 6.76	34	4	0.019	1.3
21	26 S protease regulatory subunit 6 A	PRS6A_HUMAN	49458/ 5.13	117	30	0.006	1.4
22	Proteasome subunit alpha type-1	PSA1_HUMAN	29822/ 6.15	166	39	0.001	1.2
23	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN	29155/ 4.63	96	4	0.007	1.4
24	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_HUMAN	32097/ 6.45	542	40	0.019	1.2
25	Putative inactive group IIC secretory phospholipase A2	PA2GC_HUMAN	16833/ 8.84	13	14	0.016	1.2
26	Putative uncharacterized protein FLJ45999	YL004_HUMAN	18957/ 10.14	32	10	0.012	1.2
27	Putative zinc finger protein 861	ZN861_HUMAN	11989/ 8.91	30	17	0.037	1.2
28	RuvB-like 1	RUVB1_HUMAN	50538/ 6.02	64	19	4.7E-04	1.3
29	Serine/threonine-protein phosphatase 2 A activator	PTPA_HUMAN	40641/ 5.63	246	17	1.1E-04	1.3
30	Uroporphyrinogen decarboxylase	DCUP_HUMAN	40761/ 5.77	32	2	0.007	1.3
31	Uroporphyrinogen decarboxylase	DCUP_HUMAN	40761/ 5.77	134	8	0.010	1.2



of DTT (15 min, RT) in order to accomplish reduction of disulfide bonds, followed by derivatization of cysteine residues with equilibration buffer containing 4% of iodacetamide (15 min, RT).

Second-dimension separation was performed using Ettan DALT six electrophoresis system (GE Healthcare) using 12.5% SDS-PAGE running overnight with a power of 1 W per gel and at a constant temperature of 15 °C. A preparative 2D-gel stained with coomassie blue, containing equal amount of each non-labeled pooled samples mixed with 50 µg of IS labeled sample, in a total of 700 µg of proteins, was performed for further spot cutoff for mass spectrometry (MS) protein identification. Introducing some labeled sample into preparative gel facilitates gel match with analytical gels for spot location and picking for MS analysis.

#### 2.4. 2D-DIGE image analysis

Each gel was scanned at 100 µm resolution using an Amersham Biosciences Typhoon 8400 variable imager, resulting in two images, one for the IS and one for the sample. To improve the signal collection capabilities of the instrument and avoid image saturation, a prescan was performed to check and adjust the photomultiplier tube (PMT) voltages of the different channels that were set to values between 500 and 550 V.

Spot detection, gel matching, and statistical analysis were performed with Progenesis SameSpots, version 4.5 (Nonlinear Dynamics, UK). Abundance values of matched spots across all gel images, expressed as normalized volume, were compared between groups, so that each spot could be assigned a score of relative significant difference, in terms of *p* value ( $< 0.05$ ). Relative content alteration of each spot across the study groups was expressed by fold change values, which were calculated by the ratio of the mean normalized volumes of a certain spot in each condition. Spots decreasing their abundance were represented by negative fold values, calculated as the inverse of the previous ratio multiplied by  $-1$  (Fig. 1).

#### 2.5. Protein identification

After in-gel digestion of protein spots collected from the preparative gel, proteins were identified by MS. The protein spot picking was performed manually. In-gel digestion was performed as described before [2]. Tryptic peptides, prepared in 50% (v/v) ACN and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), were directly deposited on a 192-well matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) plate with 5 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA, 1:1), prepared in 0.1% TFA/60% ACN (v/v) and allowed to co-crystallize at RT. Peptides were analyzed on an Applied Biosystems 4700 MALDI Proteomics Analyzer (with time-of-flight/time-of-flight (TOF/TOF) ion optics exactly as described before [2,3]. The identified proteins are displayed in the Table.

#### 2.6. Protein annotation and classification

Protein annotation properties were acquired using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 [6]. This open-source tool retrieves a set of biological and functional information such as GO terms, subcellular location, molecular function and association with biological process and/or disease with *p*-values of over-representation  $\leq 0.05$  (Fig. 2)

#### Acknowledgements

To patients that voluntarily collaborated in this study and Eunice Matos for collaborating in sample biobanking. Project partially supported by Harvard Medical School-Portugal Program (HMSP-ICJ/0022/2011), ToxOmics - Centre for Toxicogenomics and Human Health (FCT-UID/BIM/00009/2013), FCT/Poly-Annual Funding Program and FEDER/Saúde XXI Program (Portugal) and postdoctoral fellowship SFRH/BPD/43365/2008 of Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal.

**Transparency document. Supplementary material**

Transparency data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.01.005>.

**References**

- [1] A. Feliciano, F. Vaz, V. M. Torres, C. Valentim-Coelho, R. Silva, V. Prosinecki, B. Alexandre, A. S. Carvalho, R. Matthiesen, A. Malhotra, P. Pinto, C. Bárbara, D. Penque, Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state variation in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameters, *Biochim Biophys Acta*. 1863, 2017, 621–629. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.019>.
- [2] N. Charro, B.L. Hood, D. Faria, P. Pacheco, P. Azevedo, C. Lopes, A.B. de Almeida, F.M. Couto, T.P. Conrads, D. Penque, Serum proteomics signature of cystic fibrosis patients: a complementary 2-DE and LC-MS/MS approach, *J. Proteom.* 74 (2011) 110–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.10.001>.
- [3] S.A. Pacheco, V.M. Torres, H. Louro, F. Gomes, C. Lopes, N. Marçal, E. Fragoso, C. Martins, C.L. Oliveira, M. Hagenfeldt, A. Bugalho-Almeida, D. Penque, T. Simões, Effects of occupational exposure to tobacco smoke: is there a link between environmental exposure and disease? *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 76 (2013) 311–327. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2013.757269>.
- [4] S.G. Rhee, K.-S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo, T.-S. Chang, Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification, *Antioxid. Redox Signal*, 7, pp. 619–626. doi:<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2005.7.619>.
- [5] R. a Poynton, M.B. Hampton, Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta*. 1840 (2014) 906–912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.001>.
- [6] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](http://www.elsevier.com/locate/bbadis)

## Evening and morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state changes in obstructive sleep apnea red blood cells: Correlation with polysomnographic and metabolic parameters

Amélia Feliciano<sup>a,b</sup>, Fátima Vaz<sup>b,c</sup>, Vukosava M Torres<sup>b,c</sup>, Cristina Valentim-Coelho<sup>b</sup>, Rita Silva<sup>b</sup>, Vesna Prosinecki<sup>b</sup>, Bruno M Alexandre<sup>b</sup>, Ana S Carvalho<sup>d</sup>, Rune Matthiesen<sup>d</sup>, Atul Malhotra<sup>e</sup>, Paula Pinto<sup>a,f</sup>, Cristina Bárbara<sup>a,f</sup>, Deborah Penque<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte (CHLN), Lisboa, Portugal

<sup>b</sup> Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal

<sup>c</sup> ToxOmics- Centre of Toxicogenomics and Human Health, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

<sup>d</sup> Departamento da Promoção da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal

<sup>e</sup> Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine Division, University of California San Diego, CA, USA

<sup>f</sup> Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 August 2016

Received in revised form 18 October 2016

Accepted 14 November 2016

Available online 15 November 2016

#### Keywords:

Obstructive sleep apnea

Peroxiredoxin-2

Red blood cells

Biomarkers

### ABSTRACT

We have examined the effects of Obstructive Sleep Apnea (OSA) on red blood cell (RBC) proteome variation at evening/morning day time to uncover new insights into OSA-induced RBC dysfunction that may lead to OSA manifestations. Dysregulated proteins mainly fall in the group of catalytic enzymes, stress response and redox regulators such as peroxiredoxin 2 (PRDX2). Validation assays confirmed that at morning the monomeric/dimeric forms of PRDX2 were more overoxidized in OSA RBC compared to evening samples. Six month of positive airway pressure (PAP) treatment decreased this overoxidation and generated multimeric overoxidized forms associated with chaperone/transduction signaling activity of PRDX2. Morning levels of overoxidized PRDX2 correlated with polysomnographic (PSG)-arousal index and metabolic parameters whereas the evening level of disulfide-linked dimer (associated with peroxidase activity of PRDX2) correlated with PSG parameters. After treatment, morning overoxidized multimer of PRDX2 negatively correlated with fasting glucose and dopamine levels.

Overall, these data point toward severe oxidative stress and altered antioxidant homeostasis in OSA RBC occurring mainly at morning time but with consequences till evening. The beneficial effect of PAP involves modulation of the redox/oligomeric state of PRDX2, whose mechanism and associated chaperone/transduction signaling functions deserves further investigation. RBC PRDX2 is a promising candidate biomarker for OSA severity and treatment monitoring, warranting further investigation and validation.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a sleep-associated respiratory disorder, characterized by recurrent episodes of apneas and hypopneas during sleep with resultant intermittent hypoxia and sleep fragmentation [1]. OSA affects about 22% of men (range, 9–37%) and 17% of women (range, 4–50%) but frequently is underdiagnosed [2]. OSA is associated with cancer [3] and cerebral, cardiovascular and metabolic pathologies [4], making this disorder a public health concern. The mechanisms responsible for these outcomes are oxidative stress and

associated inflammatory, autonomic, vascular, and metabolic events [5]. The diagnosis of OSA is based on an overnight sleep exam, that can be a laboratory polysomnography (PSG) or, in some patients, a portable cardio-respiratory study [6]. Presently, positive airway pressure (PAP) devices are the first line treatment for OSA [7] acting on preventing obstructive episodes and thus inhibiting the cascade of deleterious OSA-associated pathologies. PAP improves daytime somnolence, cognitive function and quality of life and prevents cerebral, cardiovascular and metabolic consequences [7]. Additionally, PAP devices seem to decrease oxidative stress and inflammation [8,9].

The expense and time consuming nature of both sleep testing and PAP treatment contribute to under diagnosis and consequently to under treatment of OSA. Identification of predictive biomarkers of OSA concerning diagnosis, prognosis and response to treatment could be

\* Corresponding author at: Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisboa 1640-016, Portugal.  
E-mail address: [deborah.penque@insa.min-saude.pt](mailto:deborah.penque@insa.min-saude.pt) (D. Penque).



useful tool in its global strategy. Several approaches to biomarker discovery, such as advanced proteomics-based technologies, have gained importance in several pathologies, including OSA [10]. By using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE) -based proteomics, we intended herein to investigate for the first time to our knowledge OSA red blood cell (RBC) proteome at two time points, before and after one night of sleep. Dysfunction in the RBC homeostasis has been described as a potential source of systemic inflammation that leads to metabolic diseases, such as obesity, insulin resistance and hypertension [11]. These disorders are also recognized as OSA associated sequelae [1,4,5]. The RBC redox-state may also play an important role in the physiology of circadian rhythms [12] and sleeplessness, hypoxia or oxidative-stress induced circadian disruption that may lead to tumorigenesis and metabolic syndrome [13,14]. Therefore, we are convinced that studies focused on the identification of dysregulated proteins in OSA RBC, before or after nocturnal intermittent hypoxia and sleep disruption could provide new insights into underlying pathological mechanisms and uncover new candidate biomarkers of OSA and OSA associated disorders. Additionally, studies evaluating the effect of PAP treatment in the modulation of these proteins will contribute to better understanding and monitoring of the effectiveness and/or side-effects of PAP therapy.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients

One hundred four consecutive male subjects with clinically suspected OSA syndrome were screened and evaluated through interviews for inclusion in this study. Before PSG study, all subjects underwent a restricted diet during three days, including no drugs to induce sleep. The PSG was performed overnight at the sleep laboratory according to standard procedures [6]. After diagnosis, PAP therapy with automatic devices (S9, Resmed, Australia) were prescribed for patients with OSA severe disease (respiratory disturbance index (RDI)  $\geq 30$ /h) or with any severity (RDI  $\geq 5$ /h) when associated with excessive diurnal sleepiness and/or cardio or cerebro vascular complications (hypertension, arrhythmia, coronary disease, cerebral or cardiac stroke) as described [15].

Patients were selected to participate in two phases of the study, namely discovery and validation phase. For the discovery phase, 12 subjects diagnosed with primary snoring (RDI  $< 5$ /h) and 12 subjects with moderate (RDI  $\geq 15$ /h, but  $< 30$ /h) ( $n = 5$ ) or severe OSA (RDI  $\geq 30$ /h) ( $n = 7$ ) were selected (Cohort I, Table 1). For validation phase, 10 subjects with primary snoring (RDI  $< 5$ /h) and 10 subjects with mild (RDI  $\geq 5$ /h, but  $< 15$ /h) ( $n = 4$ ) or moderate to severe OSA (RDI  $\geq 15$ /h) ( $n = 6$ ) that underwent six month of PAP treatment were selected (Cohort II, Table 2). Exclusion criteria were female gender (to avoid hormonal influence), shift workers, other sleep disorders, neuromuscular disease, heart failure, diabetes, neoplasia, acute disease and previous PAP treatment.

### 2.2. Sample collection & biochemical analysis

At the day of hospitalization, 24 h urine was collected for catecholamine determination, according to the hospital standard procedures. Blood samples were collected into EDTA-coated polypropylene tubes before and after PSG i.e., between 8:00 pm and 09:30 pm (referred to as 'evening') and between 7:30 am and 09:00 am.

(referred to as 'morning'). Patients who underwent PAP treatment, a second blood sample was collected after six months of treatment under the same conditions as above described but at morning time only. Hematological and metabolic analyses were immediately performed on morning samples according to the hospital procedures. For proteomics study, samples were kept no longer than 4 h at 4 °C until fractionation.

**Table 1**

Cohort I - discovery phase.

Phase demographic, polysomnographic and analytical characterization			
Demographic and PSG parameters	Screened subjects		
	snorer ( $n = 12$ )	OSA ( $n = 12$ )	p value
Age (years)	46.8 (10.0)	45.8 (7.2)	NS
Habits			
Current smoking (n)	6	4	NS
Current drinking (n)	7	6	NS
EPW Score	9.1 (4.3)	11.7 (6.5)	NS
Observational features			
Morning arterial pressure (mmHg)	141.3 (23.1)/ 88.8 (14.6)	129.8 (13.1)/ 78.9 (8.3)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.9 (2.7)	30.8 (1.9)	0.0002
Abdominal perimeter (cm)	97.5 (6.9)	107.4 (8.6)	0.005
Comorbidities			
Hypertension (n)	6	4	NS
Respiratory diseases (n)	3	1	NS
Dyslipidemia (n)	8	10	NS
Polysomnographic parameters			
RDI (events/h)	2.7 (1.5)	41.9 (20.5)	5.96E-07
Arousal Index (events/h)	12.6 (4.8)	34.6 (18.4)	0.0003
Minimum arterial saturation (%)	87.4 (4.1)	80.5 (7.6)	0.006
T90 (%)	0.1 (0.2)	19.4 (24.6)	0.006
ODI (events/h)	3.0 (4.4)	41.2 (27.0)	3.79E-05
Sleep efficiency (%)	76.7 (14.1)	82.1 (6.8)	NS
Analytical parameters			
Glycemic profile			
Glucose (70–110 mg/dl)	95.2 (8.5)	96.7 (12.0)	NS
Hb A1C (4–6%)	5.7 (0.4)	5.8 (0.4)	NS
Insulin (3–25 mU/l)	11.0 (6.2)	20.6 (12.5)	0.013
HOMA-IR ( $\geq 3.8$ )	2.6 (1.6)	5.0 (3.0)	0.012
Lipid profile			
Cholesterol ( $< 190$ mg/dl)	206.2 (44.3)	193.0 (30.8)	NS
Triglycerides ( $< 150$ mg/dl)	127.3 (69.7)	217.1 (127.7)	0.022
Cardiovascular marker			
Homocysteine (3.7–13.9 $\mu$ mol/l)	15.6 (4.3)	15.1 (2.9)	NS
Urinary catecholamines			
Adrenalin (1.7–22.4 $\mu$ g/24 h)	15.0 (15.5)	10.8 (9.3)	NS
Nor-adrenalin (12.1–85.5 $\mu$ g/24 h)	73.5 (34.0)	75.0 (37.4)	NS
Dopamine (0–498 $\mu$ g/24 h)	389.4 (218.4)	367.3 (169.5)	NS
Complete hemogram			
RBC ( $4.5\text{--}5.9 \times 10^{12}$ /l)	5.0 (0.4)	5.1 (0.5)	NS
Hemoglobin (13–17.5 g/dl)	15.4 (0.8)	15.2 (1.6)	NS
Hematocrit (40–50%)	45.9 (2.1)	45.1 (4.1)	NS
MCV (80–97 fl)	91.9 (6.4)	88.9 (4.1)	NS
MCH (27–33 pg)	30.9 (1.8)	30.0 (1.6)	NS
MCHC (31.5–35.5 g/dl)	33.6 (1.0)	33.7 (1.1)	NS
RDW (11.5–14.5)	13.4 (0.7)	13.5 (0.9)	NS
Leukocytes ( $4.0\text{--}11 \times 10^9$ /l)	6.7 (1.2)	7.8 (2.3)	NS
Platelets ( $150\text{--}450 \times 10^3$ $\mu$ l)	237.8 (40.1)	261.7 (77.2)	NS

NS: non-statistical meaning.

EPW: Epworth Sleepiness Scale; BMI: body mass index; RDI: respiratory disturbance index; T90%: time spent with saturation  $< 90\%$ ; ODI: oxygen desaturation index; HbA1C: hemoglobin glycosylated; HOMA-IR: model assessment of insulin resistance; RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width.

The obtained RBC pellets were aliquoted and stored at  $-80$  °C until analysis.

### 2.3. 2D-DIGE based proteomics discovery phase

RBC sample preparation, analysis by 2D-DIGE approach followed by mass spectrometry for protein identification and protein annotation and classification using dedicated bioinformatics tools are described in detail in [16].

### 2.4. Validation phase

The validation of proteomics data was performed for peroxiredoxin 2 (PRDX2) on samples from Cohort II (Table 2).

**Table 2**  
Cohort II - validation phase.

Demographic, polysomnographic and analytical characterization					
Demographic and PSG parameters	Screened subjects				
	Snorer (n = 10)	OSA (n = 10)	PAP (n = 10)	p value Snorer vs OSA	p value OSA vs PAP
Age (years)	43.6 (11.9)	43.0 (7.1)	–	NS	NS
Habits					
Current smoking (n)	4	2	–	NS	n/a
Current drinking (n)	5	6	–	NS	n/a
EPW score	11.7 (4.8)	11.5 (4.5)	6.6 (4.7)	NS	0.0003
Observational features					
Morning arterial pressure (mmHg)	138.6 (21.7)/85.1 (13.5)	124.2 (18.3)/77.8 (12.3)	–	NS	n/a
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.5 (3.9)	29.6 (2.3)	–	NS	n/a
Abdominal perimeter (cm)	98.0 (9.3)	105.0 (8.8)	–	NS	n/a
Comorbidities					
Hypertension (n)	5	5	–	NS	n/a
Respiratory diseases (n)	0	0	–	NS	n/a
Dyslipidemia (n)	7	7	–	NS	n/a
Polysomnographic parameters					
RDI (events/h)	3.3 (1.2)	34.8 (26.5)	–	0.001	n/a
Arousal index (events/h)	12.8 (4.8)	34.7 (19.8)	–	0.002	n/a
Minimum arterial saturation (%)	87.4 (3.4)	81.0 (7.4)	–	0.012	n/a
T90 (%)	0.1 (0.1)	12.6 (19.5)	–	0.028	n/a
ODI (events/h)	5.2 (5.9)	28.8 (27.4)	–	0.008	n/a
Sleep efficiency (%)	79.8 (14.3)	80.4 (12.7)	–	NS	n/a
PAP record					
Number of days without use	–	–	54.4 (63.7)	–	n/a
Total of recording days	–	–	200.0 (21.5)	–	n/a
Use per night (min)	–	–	269.7 (123.4)	–	n/a
Residual AHI (events/h)	–	–	1.6 (1.1)	–	n/a
Analytical parameters					
Glycemic profile					
Glucose (70–110 mg/dl)	96.1 (8.1)	95.1 (11.9)	95.3 (11.2)	NS	NS
Hb A1C (4–6%)	5.6 (0.4)	5.7 (0.4)	5.7 (0.3)	NS	NS
Insulin (3–25 mU/l)	11.5 (6.9)	20.7 (13.5)	28.9 (40.9)	0.036	NS
HOMA-IR (≥3.8)	2.8 (1.8)	5.0 (3.2)	7.2 (10.8)	0.036	NS
Lipid profile					
Cholesterol (<190 mg/dl)	200.9 (39.8)	181.1 (23.6)	178.9 (28.1)	NS	NS
Triglycerides (<150 mg/dl)	128.5 (70.7)	169.6 (90.7)	153.4 (69.9)	NS	NS
Cardiovascular marker					
Homocysteine (3.7–13.9 μmol/l)	14.7 (4.3)	14.1 (2.8)	15.4 (2.0)	NS	NS
Urinary catecholamines					
Adrenalin (1.7–22.4 μg/24 h)	17.3 (15.3)	9.9 (9.1)	20.0 (7.7)	NS	0.010
Nor-adrenalin (12.1–85.5 μg/24 h)	56.9 (15.9)	64.1 (36.9)	54.3 (25.6)	NS	NS
Dopamine (0–498 μg/24 h)	301.7 (117.7)	244.8 (105.5)	258.8 (123.3)	NS	NS
Complete hemogram					
RBC (4.5–5.9 × 10 <sup>12</sup> /l)	5.0 (0.5)	5.1 (0.4)	4.9 (0.3)	NS	0.018
Hemoglobin (13–17.5 g/dl)	15.4 (0.9)	15.5 (1.2)	15.1 (1.0)	NS	0.041
Hematocrit (40–50%)	45.7 (2.4)	45.7 (3.3)	44.1 (3.1)	NS	0.008
MCV (80–97 fl)	91.5 (5.3)	89.5 (3.3)	89.7 (3.4)	NS	NS
MCH (27–33 pg)	30.7 (1.2)	30.2 (1.3)	30.7 (1.2)	NS	NS
MCHC (31.5–35.5 g/dl)	33.6 (1.1)	33.8 (0.9)	34.3 (0.8)	NS	0.051
RDW (11.5–14.5)	13.3 (0.5)	13.2 (0.9)	13.8 (0.6)	NS	0.030
Leukocytes (4.0–11 × 10 <sup>9</sup> /l)	7.1 (1.0)	7.6 (1.8)	7.2 (1.8)	NS	NS
Platelets (150–450 × 10 <sup>3</sup> μl)	241.5 (31.1)	238.5 (46.2)	203.4 (47.8)	NS	0.012

NS: non-statistical meaning; n/a: not-applicable.

EPW: epworth sleepiness scale; BMI: body mass index; RDI: respiratory disturbance index; T90%: time spent with saturation < 90%; ODI: oxygen desaturation index; AHI: apnea-hypopnea index; HbA1C: hemoglobin glycosylated; HOMA- IR: model assessment of insulin resistance; RBC: red blood cells; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red cell distribution width.

PRDX2 was evaluated by a non-reduced 4–12% SDS-PAGE mini gels followed by western blotting (WB) using 1:20,000 rabbit anti-PRDX2 or 1:3000 rabbit anti- PRDX-SO<sub>2/3</sub> antibody (Ab; Abcam) to investigate PRDX-2 redox-oligomeric state as described [17]. Before lyses, 100 mM of N-ethylmaleimide (NEM) was added to the samples to prevent exogenous-induced oxidation [17].

## 2.5. Statistical analysis

Descriptive analyses for clinical and analytical data were expressed as mean ± standard deviation (SD), and frequency (% values) was used to characterize the groups. One-way ANOVA (analysis of variance) was used to compare statistically more than two groups; Paired Student-*t*-test was used to compare evening and morning condition in

the same group set (Snorer or OSA), and to evaluate the effect of (before/after) PAP treatment in OSA group set. Student-*t*-test for independent samples was used to compare Snorer and OSA groups at evening or morning condition. Correlation of variables was carried out using Pearson Correlation test. The level of statistical significance was set at 5% (*p*-value < 0.05).

## 3. Results

### 3.1. Patients: clinical, biochemical and metabolic characteristics

Results are summarized in Tables 1 and 2. In both, Cohort I (Discovery phase) and Cohort II (Validation phase), significant differences were observed regarding the PSG parameters and the insulin and insulin



resistance, determined by homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) levels, which are higher in OSA patients compared with Snorers ( $p < 0.05$  Student *t*-test). No significant differences were observed for the other parameters, except that in Cohort I, significant differences were observed in the body mass index (BMI) and triglycerides level, both were higher in OSA patients compared to Snorers (Student *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 1). No significant differences were found in these parameters between OSA and Snorer groups participating in Cohort II (Table 2).

After six month of PAP treatment (compliance with mean usage  $> 4$  h.night<sup>-1</sup>), patients reported a significant decrease in excessive daytime somnolence, evaluated by the Epworth Sleepiness Scale (EPW) score (Paired Student *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

The urinary catecholamine, adrenalin, was significant higher, while no differences were observed for nor-adrenaline and dopamine after treatment. The Hemogram data, although showing clinical normal reference values, it revealed a small, but significant, decrease in the RBCs and platelets count, haemoglobin concentration and hematocrit in patients after PAP treatment. The mean corpuscular hemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW) were significantly higher in response to treatment (Paired Student *t*-test,  $p < 0.05$ ). There were no significant changes in glucose and lipid profile and cardiovascular marker after treatment (Table 2).

### 3.2. Day or night variations in OSA RBC proteome

950 protein spots were visualized on 2DIGE images. 76 of these exhibited significant differences in abundance (fold change  $\geq 1.2$ ; Anova  $p < 0.05$ ) between OSA and Snorer's at evening or morning times (Fig. 1 - Data in Brief [16]).

From these spots, 31 were identified by MS, corresponding to 21 unique proteins suggesting the existence of post-translational modification (PTM) regulations (Table 1-Data in Brief [16]).

Some of these proteins/proteoforms showed abundance changes exclusively in OSA morning or OSA evening compared with the ones from Snorers or between morning and evening whatever is OSA or Snorers (Fig. 2-Data in Brief [16]). Functional analysis by DAVID Bioinformatics Resources [18] showed that most identified proteins are associated with catalytic, oxidoreductase, peroxidase, hydrolase, ATPase and antioxidant activity and nucleoside binding. Concerning biological process, OSA morning differential proteins were mainly associated with negative regulation of metabolic, cellular and biological processes and response to chemical stimulus. OSA evening differential proteins were mostly associated with positive regulation of catalytic activity and molecular function and catabolic and metabolic process. Morning compared with evening in OSA showed a larger numbers of differential proteins thus a larger number of associated biological processes, which included

response to chemical stimulus, oxidation reduction, regulation of catalytic activity and response to stress (Fig. 2-Data in Brief [16]).

### 3.3. Peroxiredoxin-2 redox/oligomeric states in OSA RBC

Acidic PRDX-2 spot, reported as hyper/oxidized proteoforms of PRDX2 [17] was one of those proteins identified higher abundant in 2DIGE maps of OSA morning samples (Anova  $p < 0.05$ ) compared to the ones from Snorers (Fig. 1).

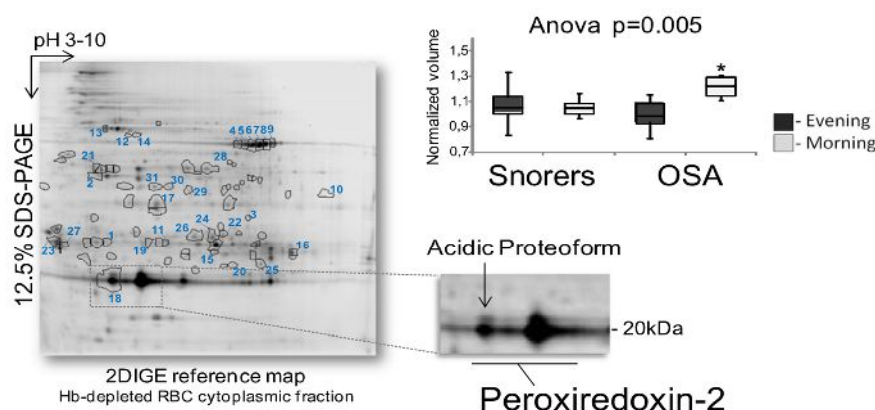
To validate whether the redox/oligomeric states of PRDX-2 are differentially modulated in OSA as indicated by the proteomics data, samples were analysed by a non-reducing WB using an antibody (Ab) against PRDX2 or against sulphinylated/sulfonylated ( $-SO_2/3H$ ) forms of PRDXs (PRDXSO<sub>2/3</sub>) [17]. A new Cohort of Snorer and OSA patients, before and after six month of PAP treatment, was used (Table 2).

As illustrated in Fig. 2A, in non-reducing SDS-PAGE condition, dimer or multimer of PRDX2 present in cells that are fully reduced or fully overoxidized are denatured and visualized as ~21 kDa monomers by WB using Ab-PRDX2. In contrast, dimeric/multimeric oxidized forms that have two disulfides (S-S/S-S) linked peroxidatic cysteins or one disulfide linked whereas the other is either reduced or overoxidized (S-S/SH or S-S/SO<sub>2</sub>H) are denatured and visualized as ~50 kDa (denominated here as S-S/S-S dimer) and 52KDa (S-S dimer), respectively [19]. Multimers fully or partially disulfide linked ( $> 200$  kDa) that are not denatured are also eventually observed [17]. However, the short exposure time used to minimize film saturation (WB detection), limited visualization and quantification of multimeric forms detected by the Ab-PRDX2 antibody. Using the Ab-PRDXSO<sub>2/3</sub> on RBC lysates analysed by a non-reducing SDS-PAGE condition, PRDX2 that contain sulphinylated (SO<sub>2</sub>H) cysteins is exclusively detected [20].

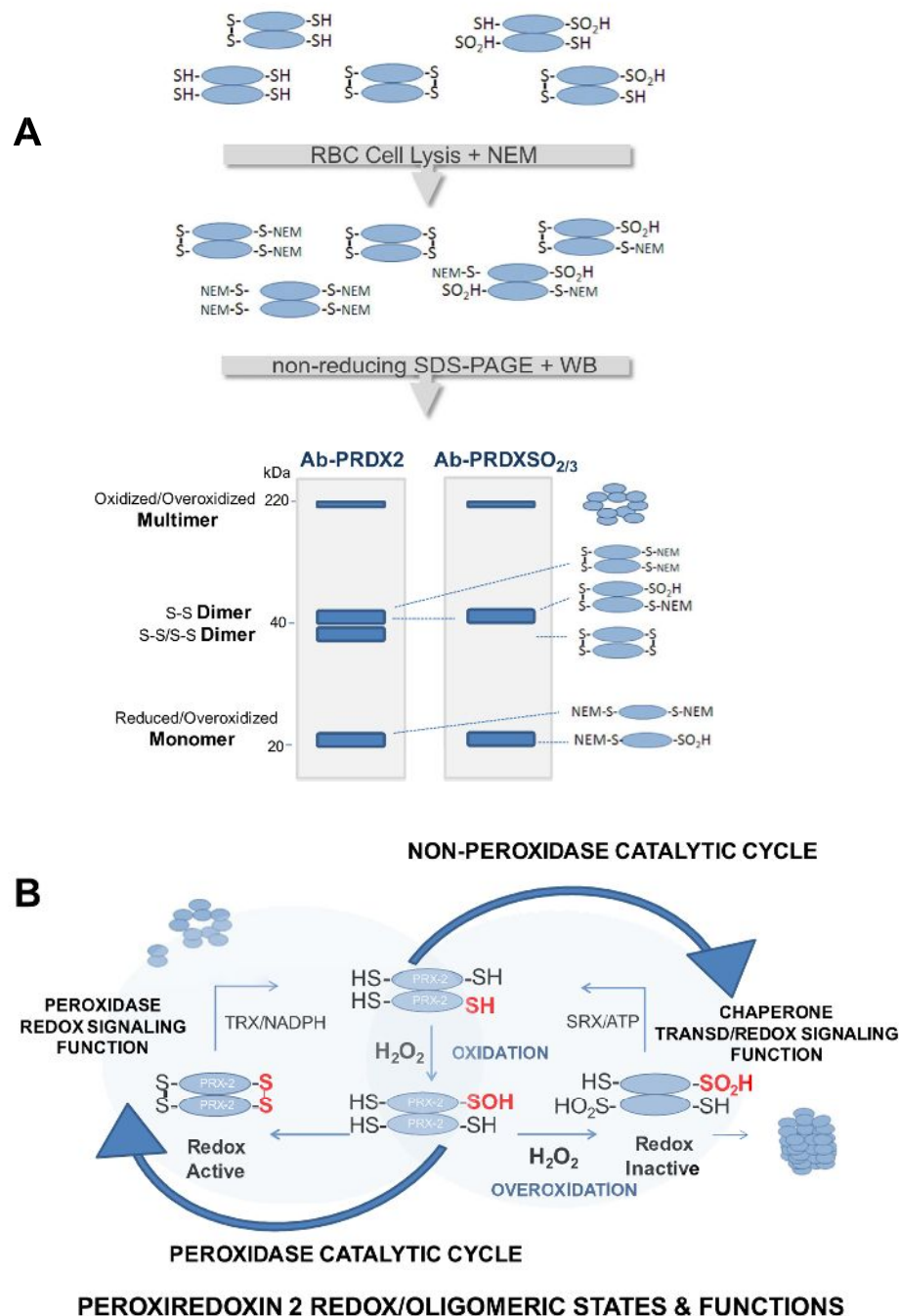
The WB results using Ab-PRDX2 showed higher abundance of PRDX2 monomers in OSA morning compared to the ones from Snorers (Figs. 3A and 4A). After PAP treatment, these levels were much increased (Fig. 4A). The WB using Ab-PRDXSO<sub>2/3</sub> confirmed that the higher levels of PRDX2 monomers in OSA were mostly overoxidized (Figs. 3B and 4B). Interestingly, the increased levels of PRDX2 monomers after PAP treatment might mostly correspond to reduced forms since their overoxidation level showed significant decrease after treatment (Fig. 4B).

In OSA, although the morning level of PRDX2 monomer was not significantly different compared with evening, its overoxidation level was higher than evening (Fig. 3B). In Snorers, the amount of PRDX2 monomer as its overoxidation level were, in contrast, significantly lower in morning compared with evening ones (Fig. 3B).

In OSA, the level of evening PRDX2 S-S/S-S oxidized dimer presented a tendency, although not significant, to be slightly higher compared with Snore ones, corroborating our Proteomics data (spot 19 in Fig. 1



**Fig. 1.** 2DIGE reference map of Hb-depleted RBC from OSA and Snorers patients collected at evening or morning day time. Differentially abundant protein/proteoforms spots are numbered and indicated with circles on the 2D-gel reference image displayed on the left. Their identity is fully described in Table 3. The acidic form of PRDX2 is one of these differentially proteins showing significantly higher levels of abundance in OSA morning samples as shown on the right.

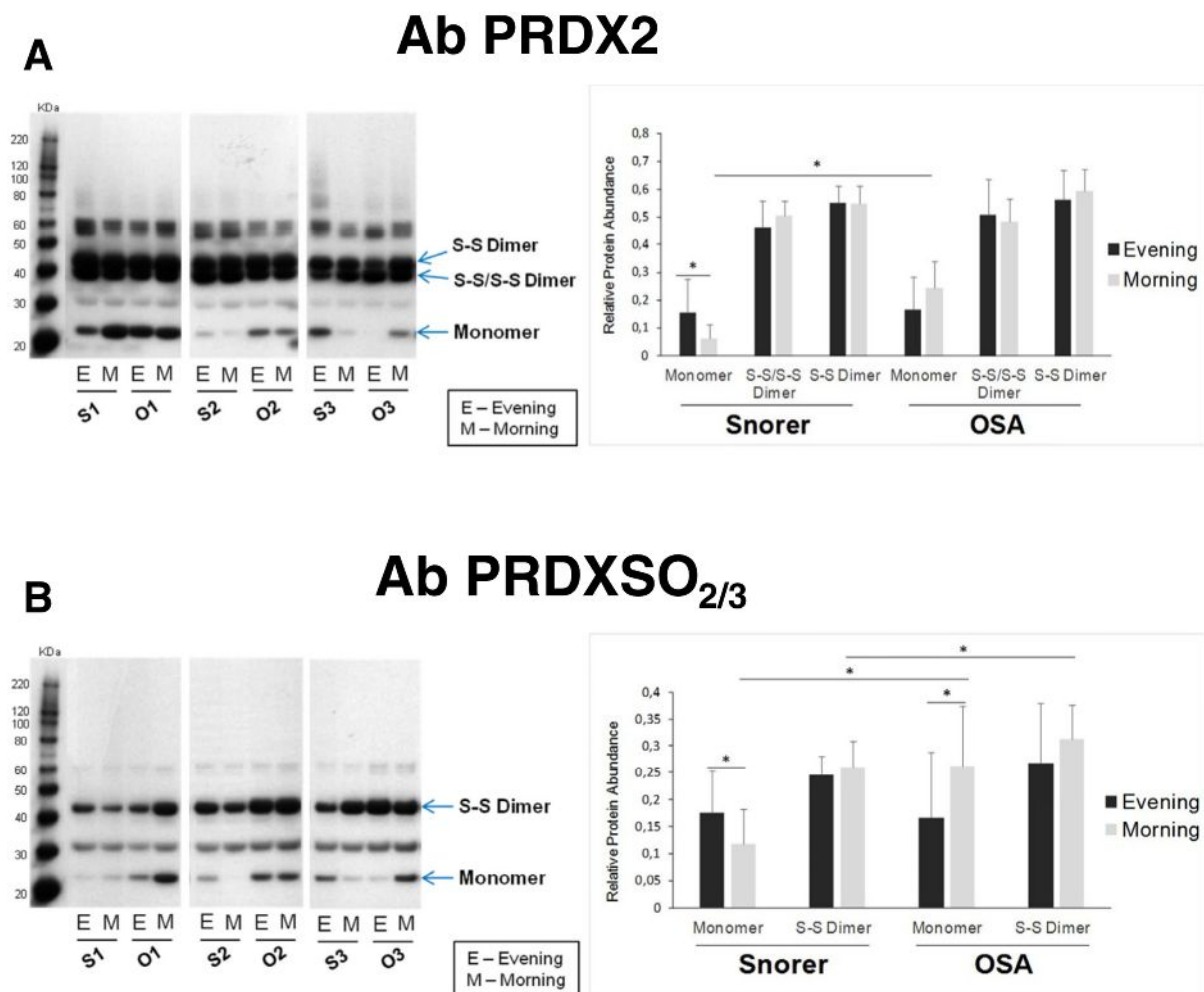


**Fig. 2.** Monitoring the redox/oligomeric states of PRDX2 as classical 2-Cys PRDX. (A) Measurement of PRDX2 redox/oligomeric states in RBCs with NEM analysed by SDS-PAGE under non-reducing condition followed by Western blotting with Ab-PRDX2 or Ab-PRDXSO<sub>2/3</sub> (adapted from [17]). NEM is added before and during RBC lyses to prevent peroxidatic cysteines from exogenous-induced oxidation. At non-reducing SDS-PAGE condition, one/two cysteine disulphide bonds linking two PRDX2 monomers into a dimer are kept and migrate at 40 kDa bands, respectively; while PRDX2 dimers composed by fully reduced or fully overoxidized cysteines are denatured into monomers migrating at a unique 20 kDa band (in other cells reduced and overoxidized monomers migrate as two close separated bands). In addition to dimers, PRDXs can form higher order oligomers, predominantly decamers, which are made from reduced, oxidized and/or overoxidized dimers. The four redox/oligomeric states are identified by the Ab-PRDX2. The Ab-PRDXSO<sub>2/3</sub> detects those PRDXs forms whose peroxidatic cysteines are overoxidized to SO<sub>2/3</sub>H acids. Dimers with two disulfide cysteine linked are thus not detected by this antibody as represented in the Fig. (B) Summarized catalytic cycles of 2-Cys PRDXs adopting different redox/conformation associated functions. Under peroxidase catalytic cycle, 2Cys-PRDX efficiently controls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration through a canonical (re)cycle via thioredoxin (TRX)/NADPH system. Peroxidase activity of 2-Cys PRDXs is not only for oxidant defence but also for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling sensing and/or transduction. In presence of high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2-Cys PRDX undergoes a non-peroxidase catalytic cycle or sulphinic (SO<sub>2</sub>H) or overoxidized cycle that is recycled to active enzyme by sulfiredoxin in the presence of ATP. Reversible oxidation is coupled to circadian rhythm to 2-Cys PRDX function. Overoxidation of 2-Cys PRDXs allows substantial accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for signalling purposes or to confer chaperone function to 2-Cys PRDX under severe oxidative stress. Chaperone activity is attributed to multimeric decameric rings of 2Cys-PRDXs.

and Table 1- Data in Brief [16]). The level of dimeric S-S form detected by Ab-PRDX2 showed no significant differences between OSA and Snorers whatever was evening or morning (Fig. 3A). However, higher

level of S-S/SO<sub>2</sub> dimeric forms detected by Ab-PRDX SO<sub>2/3</sub> was observed in OSA compared to Snorers (Fig. 3B). Interesting, these higher levels of S-S/SO<sub>2</sub> dimer at morning decreased significantly after PAP treatment





**Fig. 3.** Western blot validation of 2DIGE proteomics data indicating redox/oligomeric changes in the PRDX2 from OSA evening/morning RBC versus Snorers'. Representative western blots (on the left) of non-reducing SDS-PAGE incubated with Ab PRDX2 (A) or Ab PRDXSO<sub>2/3</sub> (B) and graphic representations (on the right) of the relative normalized protein abundance of the different redox/oligomeric forms of PRDX2 identified in the different groups/conditions [Snorers (S) or OSA/evening (E) or morning (M)] calculated from densitometric analysis (see Material & methods). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups/conditions are indicated (\*).

(Fig. 4A and B). Moreover, multimeric overoxidized forms of PRDX2 were also detected mostly exclusively in OSA patients that underwent six month of PAP treatment (Fig. 4B).

### 3.4. PRDX2 correlation with OSA clinical parameters

The correlation between the different redox/oligomeric state of PRDX2 at evening or morning time and PSG and biochemical variables were studied. To facilitate interpretation, Table 3 showed the correlations obtained for S-S/S-S dimer and overoxidized (SO<sub>2</sub>) monomers and overoxidized (S-S/SO<sub>2</sub>) dimer, since they are unequivocally associated with peroxidase catalytic cycle and non-peroxidase (overoxidized) cycle of PRDX2, respectively as represented in Fig. 3B. At evening, the level of S-S/S-S dimer positively correlated to the PSG parameters [RDI, oxygen desaturation index (ODI) and time spent with saturation <90% (T90%)] whereas the level of SO<sub>2</sub> monomer or S-S/SO<sub>2</sub> dimer negatively correlated to RDI, ODI and diurnal oximetry (Table 3).

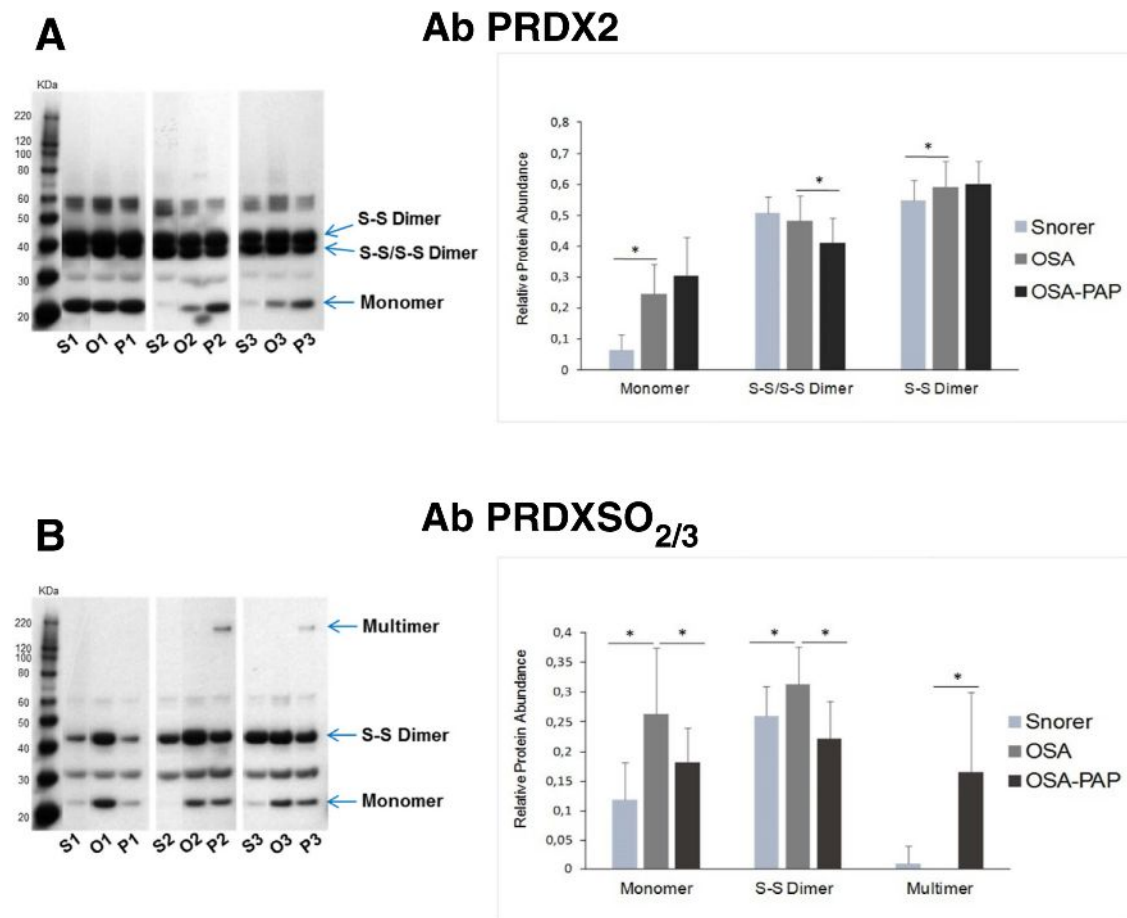
In morning samples, the level of SO<sub>2</sub> monomer positively correlated with PSG-Arousal Index while the level of S-S/SO<sub>2</sub> dimer positively correlated with glucose metabolism parameters (HbA1C, insulin and HOMA-IR) and negatively with minimum oxygen saturation. No correlation was observed for morning level of S-S/S-S dimer with clinical variables under study (Table 4). After PAP treatment, the level of morning overoxidized monomer and dimer positively correlated with triglycerides. Overoxidized dimer and multimer negatively correlated with

dopamine and fasting glucose parameters and positively with MCH hematological parameter (Table 4).

### 4. Discussion

This study examined for the first time the effect of OSA on the RBC proteome homeostasis, which dysregulation may lead to OSA severity and outcomes. Samples collected at two time points ('evening' and 'morning'), i.e., before and after night PSG, were investigated by 2DIGE-based proteomics. Proteins/proteoforms associated with RBC stress response and antioxidant regulatory system were the most changed in OSA compared with Snorers when investigated in evening or morning samples [16]. Since RBCs are devoid of any translational machinery, these day-night changes might result from PTM regulations.

PRDX2, a member of six thiol peroxidases playing a key role in the antioxidant defense and redox signaling [17], is one of those proteins changed in OSA RBC. PRDX2 is the third most abundant protein in RBC, which circadian redox events has been reported as involved in the mechanism for timekeeping [21]. PRDXs have been demonstrated to regulate several diseases related to redox-dependent process [22]. Modulations in the redox state or oligomeric structure of PRDXs can have a significant impact on their function and thus in the signaling cascades of events in which it participates [21]. In our proteomics study, acidic forms of PRDX2 described as overoxidized [17] were significantly increased in OSA morning RBCs.



**Fig. 4.** Effect of six months of PAP treatment on the redox/oligomeric state of PRDX2 from morning RBC. Representative western blots images (on the left) of non-reducing SDS-PAGE incubated with Ab PRDX2 (A) or Ab PRDXSO<sub>2/3</sub> (B) and graphic representations (on the right) of the relative normalized protein abundance of the different redox/oligomeric forms of PRDX2 identified in the different patients group (Snorers (S), OSA before and after PAP (P) calculated from densitometric analysis (see Material & methods). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups/conditions are indicated (\*).

**Table 3**  
Correlation of redox/oligomeric state of PRDX2 to PSG and metabolic variables under study.

PRDX2	Evening			Morning		
	Correlate	Pearson r value	p value	Correlate	Pearson r value	p value
S-S/S-S dimer	RDI	0.633*	0.049	No significant correlation observed		
	RDI	0.633*	0.049			
	ODI	0.657*	0.039			
	T90%	0.727*	0.017			
SO <sub>2</sub> monomer	RDI	-0.399	0.081	PSG-arousal index	0.482*	0.031
	RDI	-0.399	0.081			
	ODI	-0.474*	0.035			
	Diurnal oximetry	-0.823**	0.000			
S-S/SO <sub>2</sub> dimer	Diurnal oximetry	-0.467*	0.038	Min O <sub>2</sub> saturation	-0.586**	0.007
				Hb A1C	0.452*	0.045
				Insulin	0.448*	0.048
				HOMA-IR	0.448*	0.048

RDI, respiratory disturbance index; ODI, oxygen desaturation index; T90%, the time spent with saturation < 90%; PSG, polysomnography; Min O<sub>2</sub> saturation, minimum oxygen saturation HbA1C, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostatic model.

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

PRDX2 are obligate homodimers as minimal functional unit. As typical 2-Cys PRDX, the PRDX2 peroxidatic cysteine of one subunit reacts with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and is oxidized to sulfenic acid derivatives (-SOH) that form a disulfide (-S-S-) bound with the resolving cysteine of another subunit. Oxidized dimeric form is subsequently reduced by thioredoxin (Trx) system to enable further peroxidase catalytic cycle of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Occasionally and with increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, 2-Cys PRDXs can be overoxidized to sulphinic and sulphonic acids (Cp-

**Table 4**  
Correlation of redox/oligomeric state of PRDX2 to metabolic variables under study after PAP treatment.

PRDX2	Morning		
	Correlate	Pearson r value	p value
SO <sub>2</sub> monomer	Fasting glucose	-0.810**	0.005
	Triglycerides	0.713*	0.021
S-S/SO <sub>2</sub> dimer	Triglycerides	0.770**	0.009
	Dopamine	-0.666*	0.035
SO <sub>2</sub> multimer	Fasting Glucose	-0.842**	0.002
	Dopamine	-0.697*	0.025
	MCH	0.713*	0.021

MCH, mean corpuscular hemoglobin.

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



SO<sub>2/3</sub>H), resulting in the inactivation of its peroxidase activity as explained by the “floodgate” hypothesis [23]. Overoxidation to sulphinic acids may then be recycled to peroxidatic active forms by sulfiredoxin in an ATP-dependent reaction [17]. These two alternative catalytic cycles of 2-Cys PRDXs, the peroxidase one and the non-peroxidase, i.e., the sulphinic acid (overoxidized) one, involves dramatic changes in its quaternary structure and function (Fig. 2B). Reduced 2-Cys PRDXs can exist as decamer or dodecamer forms and dynamically exchange subunits with cellular pool. Upon oxidation, decamer dissociates into dimers to recover peroxidase activity through Trx-reduction recycling. Overoxidation and probably other PTMs interfere with subunit exchange and stabilized the decameric structure into higher-order of multimerization [24]. Reversible overoxidation of 2-Cys PRDXs has been seen as an evolutionary adapted mechanisms to allow H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent cell signaling purposes, circadian rhythm to PRDXs recycling/function and chaperone function in response to severe oxidative stress [25].

To investigate whether the redox-oligomeric state of PRDX2 is differentially modulated in OSA RBC as indicated by our proteomics data, we performed non-reduced WB assays on these cells using AbPRDX2 and Ab-PRDXSO<sub>2/3</sub>. The data confirmed our proteomics results by showing that in morning samples the level of both PRDX2 monomers and disulfide linked (S-S) dimers resulting from fully and/or partially overoxidized dimers/oligomers, respectively, were significantly increased and higher overoxidized to SO<sub>2</sub>H acid in OSA compared to Snorers. Evidence from human studies has shown that untreated OSA causes oxidative stress [5]. Therefore, our findings strongly suggest that in OSA RBC the higher overoxidation of PRDX2 at morning might be a consequence of overnight hypoxia/sleep fragmentation-induced oxidative stress response.

Although between morning and evening the level of overoxidized PRDX2 monomer changed in both OSA and Snorers, probably a behavior coupled to circadian rhythm, in OSA, the level of this overoxidized form was higher in morning than evening, while in Snorers the opposite was observed, i.e., much lower in morning than evening. Whether this change in OSA causes or results from an imbalance in the circadian system of PRDX2, need to be investigated.

The evening level of PRDX2 S-S/S-S dimer positively correlated with OSA PSG diagnostic parameters such as RDI, ODI and T90% while morning levels of overoxidized forms showed negative correlation with some of these PSG parameters (Table 3). Since this dimeric form results from peroxidase enzymatic activity of the protein (Fig. 2B), these data suggest that at evening the peroxidase cycle of PRDX2 predominates in OSA and is associated with OSA severity.

At morning, no correlation was found for S-S/S-S dimer to any clinical parameters. However, the level of PRDX2 SO<sub>2</sub> monomer showed positive correlation with PSG-arousal index while S-S/SO<sub>2</sub> dimer showed positive correlation with metabolic parameters such as HbA1C, insulin and HOMA-IR (Table 3). These data suggest that at morning the non-peroxidase (overoxidation) cycle of PRDX2 predominates in OSA and is mainly associated with the metabolic status of the patients.

In RBCs, the circadian oscillation of PRDX2 overoxidation is determined by hemoglobin autooxidation [20]. Oxidative stress can induce oxidative PTMs in hemoglobin [26]. PRDX2 bind and stabilize hemoglobin against excessive oxidative stress-induced aggregation [27]. High levels of plasma glucose produce glycated hemoglobin (HbA1C), a marker of diabetes progression, making hemoglobin more amenable to oxidation [28]. Although not diagnosed as diabetics, OSA patients in this study presented higher level of insulin and HOMA-IR compared to Snorers. The HbA1C levels correlated positively ( $r = 0.561$ ,  $p = 0.01$ ) with the glucose levels in these patients (data not shown). This pre-diabetic condition associated with OSA-induced oxidative stress might explain the correlation of morning level of RBC PRDX2 overoxidation with glycemic indicators.

Differential associations of circulating PRDXs (PRDX1,2,4 and 6) levels with indicators of glycemic control and triglycerides in type 2

diabetes mellitus have been reported [29,30]. However, intracellular PRDX2 is a peroxidase and chaperone/transduction signaling protein whereas plasma PRDX2 that is stress-induced secreted from different cells such as activated macrophages presented chemokine-like actions enabling induction of inflammatory responses [31]. More studies will be needed to better define the role(s) of PRDX2 proteoforms in different cells and subcellular location under disease associated with redox imbalance oxidative condition such as OSA and OSA-associated metabolic disorders.

The existence of morning RBC samples of OSA patients after six months of PAP treatment allowed us to investigate the therapeutic effect of PAP in the modulation of RBC PRDX2 at least, at this day time. After treatment, the morning higher level of overoxidation of both PRDX2 SO<sub>2</sub> monomer as S-S/SO<sub>2</sub> dimer showed a significant decrease. Since the total level of PRDX2 monomers showed increases after PAP the decrease in its overoxidation state might be followed by an increase of reduced (-SH) forms of the protein. Interesting, however was that, overoxidized (SO<sub>2</sub>) multimer of PRDX2 (>200 kDa) was identified almost exclusively in the majority OSA patients after PAP treatment and in two Snorers patient's controls. Multimeric overoxidized PRDXs is associated with chaperone function, although chaperone function can be independently modulated by protein PTM regulation. Any redox state or multimeric structure of PRDXs is also associated with redox signaling functions of the protein [17].

The therapeutic effect of PAP in the reduction of PRDX2 overoxidation associated with putative activation of chaperone and/or transduction signaling function of PRDX2 as suggested by these findings warrants further investigation of its mechanisms of action and its relation with oxidative stress and/or inflammation control by PAP treatment.

After PAP treatment, the morning level of RBC overoxidized PRDX2 multimer negatively correlated with the level of serum glucose and urine catecholamine dopamine (Table 4). OSA-induced sympathetic activity following an increased catecholamines secretion is associated with cardiovascular disorders and disturbance in glucose metabolism [32]. The effects of PAP on sympathetic activity and glucose homeostasis control are still debated [33,34]. In this study, although no significant changes in the catecholamine and glycemic profiles were observed after PAP, except in adrenalin that slightly increased after treatment, the level of dopamine positively correlated ( $r = 0.796$ ,  $p = 0.006$ ) with glucose level after PAP (data not shown).

Interestingly, RBCs are capable of transport, accumulation and metabolism of catecholamines, whose biological significance remains unclear [35]. Under physiological conditions catecholamines, in particular dopamine, are higher concentrated in RBCs than in plasma via an active transport regulated by insulin [36]. The putative association of RBC PRDX2 to this process as suggested by its positive correlation with insulin and negative correlation with dopamine and glucose in OSA before and after PAP, respectively, deserves further elucidation.

There are some limitations of this study. Sample size, female gender exclusion, OSA group constituted by non-diabetics with higher levels of blood insulin and HOMA-IR and Snorers group constituted by non-completely healthy subjects limit the data generalization. Although patients were instructed to follow a restricted diet for three days before urine/blood collection to minimize its impact in patient's antioxidant status and catecholamine determination, their dietary habits were not fully controlled. The evaluation of two time points (evening and morning) can provide important insights to a sleep disease like OSA but are not sufficient to study circadian rhythmicity of protein expression or activity. Since no evening samples were collected after treatment, further studies on PRDX2 redox-oligomeric state at this day time will be necessary to complete the data. Proteomics and validation analysis were performed on -80 °C stored samples, which could introduce some bias in the molecular events of both control and disease samples.



## 5. Conclusions

In summary, the present findings demonstrated evening and morning differential alterations in OSA RBC proteome probably in consequence of nocturnal apnea-induced intermittent hypoxia/sleep disruption experienced by these patients. The antioxidant defense and/or redox-signaling involving PRDX2 seemed highly modulated and correlated with OSA severity and/or metabolic status of the patients. The observed proteome changes point toward oxidative stress and/or decreased antioxidant capacity in OSA mainly at morning time but with consequences along the day. Six months of PAP significantly increased chaperone/transduction signaling function of RBC PRDX2 that might be linked with beneficial effects of PAP in improving oxidative-stress and metabolic status of the patients. The redox/oligomeric state of RBC PRDX2 is promising candidate biomarker for OSA disease severity and PAP therapeutic management that warrants further investigation and validation in larger population.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

## Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

## Acknowledgment

To patients that voluntarily collaborated in this study. Project partially supported by Harvard Medical School-Portugal Program (HMSP-ICJ/0022/2011), ToxOmics - Centre for Toxicogenomics and Human Health (FCT-UID/BIM/00009/2013), FCT/Poly-Annual Funding Program and FEDER/Saúde XXI Program (Portugal) and postdoctoral fellowship (SFRH/BPD/43365/2008) of Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal.

## References

- [1] N.T. Ayas, A.A.J. Hirsch, I. Laher, T.D. Bradley, A. Malhotra, V.Y. Polotsky, E. Tasali, New frontiers in obstructive sleep apnoea, *Clin. Sci. (Lond.)* 127 (2014) 209–216, <http://dx.doi.org/10.1042/CS20140070>.
- [2] K.A. Franklin, E. Lindberg, Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea, *J. Thorac. Dis.* 7 (2015) 1311–1322, <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.06.11>.
- [3] J. Cao, J. Feng, L. Li, B. Chen, Obstructive sleep apnea promotes cancer development and progression: a concise review, *Sleep Breath.* 19 (2015) 453–457, <http://dx.doi.org/10.1007/s11325-015-1126-x>.
- [4] M. Sánchez-de-la-Torre, F. Campos-Rodríguez, F. Barbé, Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease, *Lancet Respir. Med.* 1 (2013) 61–72, [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(12\)70051-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70051-6).
- [5] L. Lavie, Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia — revisited — the bad ugly and good: implications to the heart and brain, *Sleep Med. Rev.* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2014.07.003>.
- [6] The AASM Manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology, and technical specifications. Scoring Manual Version 2.2, 2015.
- [7] A. Qaseem, P. Dallas, D.K. Owens, M. Starkey, J.-E.C. Holty, P. Shekelle, Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians, *Ann. Intern. Med.* 161 (2014) 210–220, <http://dx.doi.org/10.7326/M12-3187>.
- [8] F. Yagihara, L. Lucchesi, V. D'Almeida, M. de Mello, S. Tufik, L. Bittencourt, Oxidative stress and quality of life in elderly patients with obstructive sleep apnea syndrome: are there differences after six months of continuous positive airway pressure treatment? *Clinics* 67 (2012) 565–571, [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2012\(06\)04](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2012(06)04).
- [9] C. Dal-Fabbro, S. Garbui, V. D'Almeida, F.D. Cintra, S. Tufik, L. Bittencourt, Mandibular advancement device and CPAP upon cardiovascular parameters in OSA, *Sleep Breath.* 2005 (2014) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1007/s11325-014-0937-5>.
- [10] A. Feliciano, V.M. Torres, F. Vaz, A.S. Carvalho, R. Matthiesen, P. Pinto, A. Malhotra, C. Bárbara, D. Penque, Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea, *Sleep Med.* 16 (2015) 437–445, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2014.11.014>.
- [11] D. Zappulla, Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO<sub>2</sub> increases? *J. Cardiometab. Syndr.* 3 (2008) 30–34, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1559-4572.2008.07263.x>.
- [12] G. Rey, A.B. Reddy, Interplay between cellular redox oscillations and circadian clocks, *Diabetes Obes. Metab.* 17 (Suppl. 1) (2015) 55–64, <http://dx.doi.org/10.1111/dom.12519>.
- [13] M. Wilking, M. Ndiaye, H. Mukhtar, N. Ahmad, Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 192–208, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4889>.
- [14] M. Egg, L. Köblitz, J. Hirayama, T. Schwerte, C. Folterbauer, A. Kurz, B. Fiechtner, M. Möst, W. Salvenmoser, P. Sassone-Corsi, B. Pelster, Linking oxygen to time: the bidirectional interaction between the hypoxic signaling pathway and the circadian clock, *Chronobiol. Int.* 30 (2013) 510–529, <http://dx.doi.org/10.3109/07420528.2012.754447>.
- [15] A. Qaseem, J.-E.C. Holty, D.K. Owens, P. Dallas, M. Starkey, P. Shekelle, Management of obstructive sleep apnea in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians, *Ann. Intern. Med.* (2013) <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-159-7-201310010-00704>.
- [16] A. Feliciano, F. Vaz, C. Valentim-Coelho, C. Marques-Almeida, V.M. Torres, R. Silva, V. Bozanic, B. Alexandre, A. Almeida, A.S. Carvalho, R. Matthiesen, A. Malhotra, P. Pinto, C. Bárbara, D. Penque, Evening and morning alterations in obstructive sleep apnea red blood cell proteome, *Data Br.* (in press).
- [17] R.A. Poynton, M.B. Hampton, Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 906–912, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.001>.
- [18] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 44–57, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [19] A.V. Peskin, N. Dickerhof, R.A. Poynton, L.N. Paton, P.E. Pace, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 14170–14177, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.460881>.
- [20] C.-S. Cho, H.J. Yoon, J.Y. Kim, H.A. Woo, S.G. Rhee, Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1401100111>.
- [21] N.P. Hoyle, J.S. O'Neill, Oxidation–reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping, *Biochemistry* 54 (2015) 184–193, <http://dx.doi.org/10.1021/bi5008386>.
- [22] Park, M.H., M. Jo, Y.R. Kim, C.K. Lee, Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory disease, *Pharmacol. Ther.* (2016 Jul) 1–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.017>.
- [23] Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus, Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science* 300 (2003) 650–653, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1080405>.
- [24] S.G. Rhee, W. Jeong, T.-S. Chang, H.A. Woo, Sulfiredoxin, the cysteine sulfenic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance, *Kidney Int. Suppl.* (2007) S3–S8, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002380>.
- [25] S.G. Rhee, Overview on peroxiredoxin, *Mol. Cells.* 39 (2016) 1–5, <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>.
- [26] W. Xiang, V. Weisbach, H. Sticht, A. Seebahn, J. Bussmann, R. Zimmermann, C.M. Becker, Oxidative stress-induced posttranslational modifications of human hemoglobin in erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 529 (2013) 34–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.002>.
- [27] Y.-H. Han, S.-U. Kim, T.-H. Kwon, D.-S. Lee, H.-L. Ha, D.-S. Park, E.-J. Woo, S.-H. Lee, J.-M. Kim, H.-B. Chae, S.Y. Lee, B.Y. Kim, D.Y. Yoon, S.G. Rhee, E. Fibach, D.-Y. Yu, Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426 (2012) 427–432, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.113>.
- [28] C.D. Saudek, J.C. Brick, The clinical use of hemoglobin A1c, *J. Diabetes Sci. Technol.* 3 (2009) 629–634, <http://dx.doi.org/10.1177/193229680900300402>.
- [29] E.E. Eter, S. Tayel, H. Zamil, Differential Associations of Circulating Peroxiredoxins Levels With Indicators of Glycemic Control in Type 2 Diabetes Mellitus, 2014 710–716.
- [30] E. El Eter, A. Al Masri, S. Habib, H. Al Zamil, A. Al Hersi, F. Al Hussein, M. Al Omran, Novel links among peroxiredoxins, endothelial dysfunction, and severity of atherosclerosis in type 2 diabetic patients with peripheral atherosclerotic disease, *Cell Stress Chaperones* 19 (2014) 173–181, <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-013-0442-y>.
- [31] S. Salzano, P. Checconi, E.-M. Hanschmann, C.H. Lillig, L.D. Bowler, P. Chan, D. Vaudry, M. Mengozzi, L. Coppo, S. Sacre, K.R. Atkuri, B. Sahaf, L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg, L. Mullen, P. Ghezzi, Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 12157–12162, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1401712111>.
- [32] J.A. Dempsey, S.C. Veasey, B.J. Morgan, C.P. O'Donnell, Pathophysiology of sleep apnea, *Physiol. Rev.* 90 (2010) 47–112, <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00043.2008>.
- [33] I. Jullian-Desayes, M. Joyeux-Faure, R. Tamisier, S. Launois, A.-L. Borel, P. Levy, J.-L. Pepin, Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials, *Sleep Med. Rev.* 21 (2015) 23–38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2014.07.004>.
- [34] E. Martínez-Ceron, I. Fernández-Navarro, F. García-Río, Effects of continuous positive airway pressure treatment on glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnea, *Sleep Med. Rev.* 25 (2016) 121–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2015.03.002>.
- [35] L.E. Panin, P.V. Mokrushnikov, V.G. Kunitsyn, B.N. Zaitsev, Interaction mechanism of cortisol and catecholamines with structural components of erythrocyte membranes, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 9462–9473, <http://dx.doi.org/10.1021/jp911917a>.
- [36] R. Azouzi, J.L. Cuche, J.F. Renaud, M. Safar, G. Dagher, A dopamine transporter in human erythrocytes: modulation by insulin, *Exp. Physiol.* 81 (1996) 421–434.



O Estudo 3 revelou que várias proteínas se encontravam diferencialmente expressas nos doentes com SAOS relativamente aos roncadores.

Pela técnica 2DIGE foram visualizados 950 *spots* proteicos e, destes, 76 exibiam diferenças significativas na sua expressão (*fold change* 1,2; Anova  $p < 0,05$ ) entre os doentes com SAOS e os roncadores, de manhã ou à noite. A partir destes *spots* proteicos foram identificados por espectrometria de massa 31 proteínas. Estas correspondem a 21 proteínas únicas, sugerindo a existência de modificações pós traducionais. A análise funcional destas proteínas foi executada através da *DAVID Bioinformatics Resources* [319] mostrando que a maioria das proteínas identificadas estava associada a atividade catalítica, oxidoreductase, peroxidase, hidrolase, ATPase, antioxidante e de ligação a nucleósido.

A autora faz um resumo da importância funcional dessas proteínas no organismo, apresentando de forma abreviada a sua função na tabela 5.

Identificação	Descrição proteica	Função celular
ACTB_HUMAN	Actina, citoplasmática 1	Envolvimento em diversos tipos de motilidade celular.
ALDOA_HUMAN	Fructose-bifosfacto ALDOLASE A	Envolvimento na glicólise, ligação a proteínas e estabilidade do mRNA.
ARGL1_HUMAN	Proteína 1 rica em arginina e glutamato	Regulação da transcrição ao nível do núcleo.
CATA_HUMAN	Catalase	Metabolização do peróxido de hidrogénio.
DCUP_HUMAN	Descarboxilase do uroporfirinogénio	Envolvimento na produção do heme, elemento essencial à hemoglobina.
GSHO_HUMAN	Subunidade reguladora ligase glutamate-cisteína	Biosíntese do glutatíio; metabolismo do enxofre.
HBB_HUMAN	Subunidade da Hemoglobina	Transporte de oxigénio. Catabolismo do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Regulação da morte celular.
HSP71_HUMAN	Proteína do Choque Térmico de 70 kDa 1A/1B	<i>Chaperones</i> moleculares.
HSP7C_HUMAN	Cognato da Proteína do Choque Térmico de 71 kDa	<i>Chaperones</i> moleculares.
LDHB_HUMAN	Cadeia da lactato-L desidrogenase	Fermentação do piruvato a lactato.
PA2GC_HUMAN	Grupo inativo putativo secretório IIC da Fosfolipase A2	Fosfolipase inactiva.
PNPH_HUMAN	Fosforilase do Nucleósido Purina	Metabolismo das purinas. Resposta imune.
PRDX2_HUMAN	Peroxirredoxina 2	<b>Ver descrição no texto.</b>
PRS6A_HUMAN	Subunidade 6A reguladora da Protease 26S	Degradação das proteínas. Processo apoptótico.
PSA1_HUMAN	Subunidade tipo 1 do Proteassoma	Degradação de proteínas danificadas.
PTPA_HUMAN	Ativador da proteína serina/treonina da fosfatase 2A	Acelera o enrolamento de proteínas.
RUVB1_HUMAN	RuvB-like 1	Atividade de helicase do DNA.
SMCA2_HUMAN	Ativador provável da transcrição global SNF2L2	Coativador transcripcional.
1433E_HUMAN	Proteína Epsilon 14-3-3	Regulação de várias vias específicas e gerais de sinalização.
YL004_HUMAN	Proteína não caracterizada putativa LJ45999	Função incerta.
ZN861_HUMAN	Proteína 861 (putative zinc finger protein 861)	Ligação a iões metálicos.

**Tabela 5:** Resumo da função celular das proteínas identificadas por 2D-DIGE.

### Caracterização do papel da Peroxirredoxina-2

A opção pela proteína peroxirredoxina-2 teve por base a sua expressão diferencial, a sua relevância funcional nas vias de *stress* oxidativo, bem como a sua possível contribuição para a compreensão da SAOS e das possíveis vias patológicas envolvidas.

A superóxido dismutase (SOD) é uma proteína mitocondrial ubiquitária que se estima ter surgido aquando do grande evento de oxidação [320], e é a primeira enzima a catalizar as ROS, ao dismutar o superóxido (subproduto da respiração mitocondrial) em peróxido de oxigénio e oxigénio. Apesar deste seu papel, não foi detetada SOD na análise proteómica, possivelmente devido ao facto da maioria dos GV em circulação serem células maduras e, portanto, desprovidas de organelos. De seguida, o peróxido de hidrogénio produzido é convertido pela catalase, peroxidase do glutatião e peroxirredoxina em água. A catalase desempenha um papel importante na remoção de elevadas concentrações intracelulares de  $H_2O_2$  [321], mas quando em concentrações mais baixas, a peroxidase do glutatião e as peroxirredoxinas são responsáveis pela sua degradação. A catalase não parece ser tão eficaz na reação com o peróxido de hidrogénio gerado ao nível da membrana, porém a peroxidase do glutatião [292] e a peroxirredoxina-2 [293] podem desempenhar um papel na neutralização dessas ROS. Apesar das peroxirredoxinas serem mais lentas na catalização da degradação do  $H_2O_2$  do que a peroxidase do glutatião tem sido sugerido que, quando este existe em baixa concentração, as peroxirredoxinas degradam a maior parte do  $H_2O_2$  formado dentro das células. A sua elevada expressão (0.1 – 1% do total das proteínas solúveis) e a sua distribuição ubiquitária [322] fazem com que as peroxirredoxinas sejam das primeiras proteínas que o peróxido de hidrogénio encontra. Estas características combinadas com a sua rápida reatividade ( $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) determina que o peróxido de hidrogénio reage 10,000 vezes mais com as peroxirredoxinas do que com o glutatião [323]. Na presença de elevadas concentrações de  $H_2O_2$ , a catalase decompõe-no rápida e eficazmente, enquanto as peroxirredoxinas se tornam rapidamente sobre-oxidadas. Na presença de níveis celulares baixos de  $H_2O_2$ , as peroxirredoxinas eliminam-no de forma mais eficaz do que a catalase devido à sua elevada afinidade relativamente ao  $H_2O_2$ . Assim, dependendo da concentração celular do  $H_2O_2$ , as peroxirredoxinas e a catalase funcionam como peroxidases mais de forma sequencial do que de forma sinérgica.

As **peroxirredoxinas** são uma família de enzimas antioxidantes ubiquitárias, responsáveis pela degradação dos hidroperóxidos com formação de água, quer em processos fisiológicos quer patológicos, impedindo a lesão oxidativa, sendo também responsáveis pela regulação de sinalização de eventos celulares mediados pelo  $H_2O_2$  [324-326]. Esta família de proteínas está altamente conservada em todos os Filos, partilhando o mesmo mecanismo catalítico de base. Esse mecanismo ocorre graças à presença de um resíduo de cisteína cataliticamente ativo (i.e., cisteína peroxidática,  $C_P$ ) ( $C_P-SH$ ) [327]. Nos mamíferos existem 6 tipos de peroxirredoxinas, que são classificadas de acordo com o número de resíduos de cisteína conservados e o mecanismo catalítico, e que são as peroxirredoxinas 2-Cis típicas (PRDX 1-4), peroxirredoxinas 2-Cis atípicas (PRDX 5) e peroxirredoxina 1-Cis (PRDX 6). As isoformas das peroxirredoxinas existem em diferentes localizações, permitindo exercer a função de peroxidase e de sensor do  $H_2O_2$ . As peroxirredoxinas 1, 2 e 6 estão localizadas no citosol, a peroxirredoxina 3 na matrix mitocondrial, a peroxirredoxina 4 no retículo endoplasmático e a peroxirredoxina 5 na mitocondria, peroxissomas e citosol. As peroxirredoxinas 1 e 2 estão presentes sobretudo no citosol e apenas uma pequena fração destas enzimas está associada aos *rafts* lipídicos da membrana [328]. Apesar das peroxirredoxinas serem consideradas peroxidases com especificidade alargada, reduzindo substratos como o peróxido de hidrogénio, hidroperóxidos lipídicos e peroxinitritos, os quais são gerados durante a inflamação, autores sugerem que pelo menos algumas peroxirredoxinas 2-Cis típicas são mais reativas com o peróxido de hidrogénio, sendo a reatividade com outros oxidantes e alquilantes notavelmente limitada [329].

As **peroxirredoxinas** são heterodímeros orientados na forma de cabeça-cauda. Nas peroxirredoxinas 2-Cis, quando há acumulação de  $H_2O_2$ , o resíduo de cisteína na região N-terminal (cisteína peroxidática) sofre oxidação, formando ácido sulfínico, o qual reage com o outro resíduo de cisteína (da porção carboxil) de outra subunidade, formando uma ponte, o que resulta na transição da forma de monómero da enzima para a forma de dímero. Quando existem concentrações aumentadas do  $H_2O_2$ , as peroxirredoxinas 2-Cis típicas podem sofrer oxidação suplementar (designada de hiperoxidação), a qual gera formas ácidas sulfínicas ( $C_P-SO_2H$ ) e sulfónicas ( $C_P-SO_3H$ ) [330-332]. O ácido sulfónico é a forma irreversivelmente oxidada e a sua ocorrência é fisiologicamente controversa [333, 334]. Nestas formas hiperoxidadas ocorre uma

inativação da atividade de peroxidase, como explicada pela hipótese *floodgate* [331], com acumulação do  $H_2O_2$  com possível papel na sinalização. A hiperoxidação da PRDX irá também promover a sua atividade de *chaperone*. A oxidação das peroxirredoxinas 2-Cis leva à formação de multímeros de elevado peso molecular (*higher molecular weight* - HMW) que têm a função de *chaperone* e de sinalização [332, 335]. Assim, a atividade *chaperone* das peroxirredoxinas está relacionada com o seu estado de oligomerização. Os dímeros e os decâmeros são designados de compostos de baixo peso molecular (*low molecular weight* - LMW). A conversão de complexos de LMW, com atividade de peroxidase em complexos de HMW, com função de *chaperone*, requer a presença do sistema de tiorredoxina e de elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio, condições estas responsáveis pela sobre-oxidação do local ativo da cisteína [336]. A função de *chaperone* é importante na proteção das células contra o *stress* oxidativo, uma vez que previne a agregação irreversível das proteínas [336] assistindo na recuperação celular. No caso das peroxirredoxinas 2-Cis eucarióticas, condições acentuadas de *stress* oxidativo e de elevada temperatura levam à sua conversão em *chaperone* molecular, sugerindo que as peroxirredoxinas 2-Cis são capazes de detetar simultaneamente estas condições de *stress*.

# *CAPÍTULO* 5

---

## 5.1 DISCUSSÃO

Este capítulo começa com a discussão relativamente aos parâmetros clínicos, polissonográficos e analíticos do total da população recrutada, incidindo na comparação entre os doentes com SAOS e os roncadores.

### 1. Análise das características demográficas e clínicas da população recrutada

Os doentes com SAOS e os roncadores são ligeiramente mais novos (média etária de 46 e 45 anos, respetivamente) do que o habitualmente observado na prática clínica, em que a máxima incidência da SAOS se situa entre a 5<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> década de vida [25]. Relativamente às demais características demográficas avaliadas e às comorbilidades, o grupo de roncadores e o grupo de doentes SAOS eram estatisticamente semelhantes exceto relativamente à dislipidémia, tendo sido mais frequente nos doentes com SAOS, tal como já descrito na literatura [90]. Note-se que a prevalência das comorbilidades aumenta com a idade, sendo a divergência entre os doentes com SAOS e os controlos mais pronunciada depois da 6<sup>a</sup> década de vida para a maioria das doenças cardiovasculares, tais como insuficiência cardíaca, doença cardíaca isquémica, AVC e arritmias [337], e neste trabalho os grupos pertenciam a uma faixa etária mais jovem.

O facto dos doentes com SAOS serem mais obesos (IMC médio de 30,2 kg/m<sup>2</sup>) do que os roncadores (IMC médio de 27,4 kg/m<sup>2</sup>) está de acordo com a literatura [338]. A presença de obesidade mesmo nos roncadores é provavelmente devida à associação deste distúrbio metabólico com a roncopatia e a sonolência diurna levando à suspeita de SAOS nestes doentes e à sua referenciação ao laboratório do sono [339].

---

## **2. Análise das características polissonográficas da população recrutada**

Quanto à caracterização polissonográfica, a diferença estatisticamente significativa entre o grupo de doentes com SAOS e o grupo dos roncadores, quer em termos de RDI médio (de 27,6 eventos/hora e inferior a 5 eventos/hora de sono, respetivamente), quer em termos de dessaturação noturna (maior no grupo SAOS), está de acordo com a constituição destes grupos.

## **3. Análise das características analíticas da população recrutada**

O perfil analítico foi estatisticamente semelhante nos doentes com SAOS e nos roncadores. Em particular, apesar de se registar um aumento dos valores da resistência à insulina, do colesterol total e da noradrenalina no grupo de doentes com SAOS em relação ao grupo de roncadores, essa diferença não foi significativa em termos numéricos. Relativamente à homocisteína, esta apresentou-se aumentada em ambos os grupos e não se registou diferença estatisticamente significativa relativamente a este parâmetro. Estes resultados estão, provavelmente, de acordo com o facto destes grupos serem semelhantes em termos de comorbilidades, nomeadamente patologia cardiovascular, mas diferentes em termos de prevalência da dislipidémia e do IMC, ambos superiores nos doentes com SAOS, como previamente descrito [90, 338]. Atualmente existe evidência da doença cardiovascular [340-342], da obesidade [343] e da dislipidémia [340, 342] poderem ser responsáveis pelo aumento da homocisteína. Na análise dos subgrupos dos doentes com SAOS, os doentes graves apresentaram diferença estatisticamente relevante nos parâmetros do perfil glicídico (HbA1c, insulina e HOMA-IR) e no RDW relativamente aos outros subgrupos (ver discussão nos respetivos artigos).

De seguida, apresenta-se a resposta sumária às questões colocadas e que serviram de base aos estudos realizados. Quanto à sua discussão, esta foi incluída na respetiva secção de cada estudo realizado.

## **Estudo 1**

### ***Effects of positive airway pressure therapy on cardiovascular and metabolic markers in males with obstructive sleep apnea***

**Estando a SAOS associada à patologia cardiovascular, a homocisteína poderá ser usada como marcador de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?**

**Estando a SAOS associada a distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico, os parâmetros metabólicos poderão servir de marcadores de gravidade da SAOS e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?**

O **estudo 1** demonstrou que os doentes com SAOS grave podem exibir alterações do perfil glicémico mesmo na ausência de diabetes conhecida, com compromisso na glicémia, HbA1c, insulina e resistência à insulina e estes parâmetros estão correlacionados com a gravidade da SAOS. Para além disso, demonstrou que a homocisteína, os perfis glicémico e lipídico alteraram-se significativamente após 6 meses de tratamento com PAP nos doentes com SAOS grave, suportando o efeito protetor cardiovascular e metabólico da PAP.

**Podem a homocisteína e/ou os parâmetros metabólicos possibilitar a priorização diagnóstica e/ou terapêutica dos doentes com SAOS?**

Os perfis glicémico e lipídico são parâmetros acessíveis e de baixo custo, os quais devem complementar a abordagem diagnóstica dos doentes com SAOS, uma vez que permitem a priorização dos casos graves. Mais, a homocisteína e os perfis glicémico e



lipídico podem ser considerados biomarcadores válidos de resposta à terapêutica com PAP nos doentes com SAOS. Estes resultados reforçam as recomendações da *International Diabetes Federation*, que aconselha “nos doentes com SAOS rastrear por rotina os marcadores de distúrbios metabólicos e de risco cardiovascular” [344].

Após a submissão e aceitação do estudo 1 para publicação, nesta linha de investigação há a referir um estudo recente de Wu *et al.* [345], que atesta que adultos com síndrome coronário agudo admitidos para intervenção coronária percutânea apresentavam elevada prevalência de SAOS moderada/grave e que estes doentes apresentavam um aumento dos parâmetros inflamatórios, nomeadamente da homocisteína, em comparação com os doentes com SAOS ligeiros [345]. Um outro estudo [346] demonstrou que a gravidade da hipóxia noturna estava associada com a resistência à insulina em doentes com SAOS não diabéticos e não obesos e com o aumento da homocisteína. O tratamento com PAP não teve impacto no perfil glicémico, mas levou à diminuição da homocisteína em 15%, reforçando a controvérsia acerca da relação entre este biomarcador e a hipóxia intermitente.

Tem sido proposto que o grupo tiol da homocisteína sofre facilmente auto-oxidação no plasma e gera ROS, o que causa lesão das células endoteliais e a sua disfunção [180]. Assim, a homocisteína pode ser um dos fatores contributivos para o *stress* oxidativo da SAOS. Outra teoria remete para o facto de na SAOS a hipóxia intermitente levar à produção aumentada de radicais livres, o que desencadeia, por sua vez, um aumento das defesas antioxidantes, como é o caso do glutationa. Este é um dos produtos de degradação da homocisteína, que se torna aumentada para resistir ao *stress* oxidativo [347]. Por outro lado, tem sido sugerido que as alterações cíclicas da saturação da oxihemoglobina pode alterar o balanço oxidativo na SAOS ao induzir um excesso de radicais livres. Este fenómeno de hipóxia/reoxigenação produz excesso de anião superóxido, o qual inativa o óxido nítrico. Esta inativação resulta na formação de peroxinitrito, o qual inibe a inativação da homocisteína, resultando num aumento da mesma nestes doentes (revisão em [276]).

---

**Estudo 2*****Hematological evaluation in males with obstructive sleep apnea before and after Positive Airway Pressure***

**Estando a SAOS associada a patologia cardiovascular, os parâmetros do hemograma, em particular os índices eritrocitários, poderão ser usados como marcador de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP nestes doentes?**

O estudo 2 demonstrou uma associação entre os valores de RDW e a gravidade da SAOS. Adicionalmente, alguns parâmetros do hemograma (contagem de GV, hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas) diminuíram consideravelmente após 6 meses de tratamento com PAP nos doentes com SAOS, suportando o efeito protetor cardiovascular do PAP.

**Poderão os parâmetros do hemograma possibilitar a priorização diagnóstica e/ou terapêutica dos doentes com SAOS?**

O RDW pode tornar-se um biomarcador sanguíneo simples e económico, tornando-o útil na priorização dos doentes com suspeita de SAOS a aguardar PSG.

De salientar, ainda, que os parâmetros eritrocitários e plaquetários podem ser úteis no seguimento dos doentes com SAOS sob tratamento com PAP, no concreto de avaliação da resposta a este tratamento.

Após a submissão e aceitação do estudo 2 para publicação, nesta linha de investigação deve ser referido um estudo espanhol recente de León Subías E *et al.* [348]. Este estudo avaliou o RDW em 138 doentes com o diagnóstico de SAOS, obtido por estudo poligráfico em ambulatório, em comparação com 34 controlos. Estes autores reportaram que o RDW era maior nos doentes com SAOS comparativamente aos controlos e que o aumento do RDW estava diretamente relacionado com a gravidade da doença. No entanto, não foram encontradas alterações no RDW após um ano de tratamento com PAP. Dos pertinentes comentários a este estudo salienta-se o facto de ter incidido sobre uma amostra razoável de doentes com SAOS, a qual foi comparada

com uma amostra, de menor dimensão, de roncadores. No entanto, os doentes com SAOS apresentaram algumas diferenças estatisticamente significativas relativamente aos controlos, como serem mais velhos, com predomínio do género masculino, mais obesos e apresentarem níveis mais elevados de pressão arterial, colesterol, triglicéridos e glicémia. A ausência de alteração dos valores do RDW após um ano de tratamento com PAP é mais uma vez intrigante. O motivo de não ter havido alteração destes valores após a PAP pode ser justificado pelo aumento do RDW na SAOS poder estar relacionado com diversos fatores, como inflamação (com mobilização dos depósitos de ferro), idade e comorbilidades (por exemplo obesidade).

### ***Estudo 3***

#### ***Evening and morning alterations in Obstructive Sleep Apnea red blood cell proteome***

#### ***Evening-morning peroxiredoxin-2 redox/oligomeric state variation in Obstructive Sleep Apnea red blood cells: correlation with polysomnographic and metabolic parameters***

**Nos GV dos doentes com SAOS quais são as proteínas diferencialmente expressas e poderão estas servir de biomarcadores de diagnóstico?**

.....Pelo **estudo 3** verificou-se que várias proteínas estavam diferencialmente expressas entre os doentes com SAOS e os roncadores. No entanto, este estudo não permitiu estabelecer que alguma fosse considerada biomarcador de diagnóstico.

**Nos GV dos doentes com SAOS está alterada a expressão de proteínas das vias de stress oxidativo?**

O **estudo 3** verificou que nos GV dos doentes com SAOS várias proteínas se encontravam diferencialmente expressas, e destas em particular as proteínas pertencentes às vias de stress oxidativo, como é o caso da peroxirredoxina 2. Nos doentes com SAOS, as formas monoméricas/diméricas da PRDX2 estavam mais sobreoxidadas de manhã em comparação com a noite. Após 6 meses de tratamento com

PAP ocorreu uma diminuição desta sobreoxidação e foram geradas formas sobreoxidadas multiméricas, as quais se sabe apresentarem atividade de *chaperone*/transdução da sinalização da PRDX2. Verificou-se ainda que os níveis matinais de PRDX2 sobreoxidadas estavam correlacionados com o índice de despertares e parâmetros metabólicos (HbA1c, insulina, HOMA-IR) ( $p < 0,05$ ), enquanto os níveis noturnos dos dímeros dissulfido, associados com atividade peroxidase da PRDX2, estavam correlacionados com parâmetros da PSG (RDI, T90 e índice de dessaturação de oxigénio) ( $p < 0,05$ ). Após tratamento, os multímeros matinais da PRDX2 estavam correlacionados negativamente com a glucose em jejum e os níveis de dopamina urinária ( $p < 0,05$ ).

### **Essas proteínas poderão servir de marcadores de gravidade e/ou de resposta à terapêutica com PAP?**

Globalmente, estes resultados apontam para a existência de *stress* oxidativo grave e alteração da homeostasia anti-oxidante nos GV dos doentes com SAOS, ocorrendo sobretudo pela manhã mas com consequências até à noite. O tratamento com PAP apresenta um efeito benéfico na modulação do estado redox/oligomérico da PRDX2, cujo mecanismo e funções associadas de *chaperone*/transdução da sinalização merecem mais investigação. A PRDX2 eritrocitária poderá ser um biomarcador promissor da gravidade da SAOS e da monitorização ao tratamento.

De forma geral, as peroxirredoxinas constituem 0,1 – 0,8% do total das proteínas solúveis das células mamíferas e estão sobre-expressas em estados patológicos, tais como a neoplasia [349], parecendo desempenhar um papel neuroprotetor na doença de Parkinson e na doença de Alzheimer [350-352].

Nos GV existem as isoformas 1, 2 e 6 da PRDX. Em particular, a expressão da **PRDX 2** (que é uma peroxirredoxina 2-cis típica) é induzida nas fases precoces da diferenciação eritróide, antes da ocorrência da acumulação da hemoglobina (Hb) [353]. A PRDX 2 é a terceira proteína mais abundante nestas células (após a hemoglobina e a anidrase carbónica) [354]. Consiste em monómeros de 22KDa que formam homodímeros (unidade funcional), e a exposição a concentrações micromolares de peróxido de hidrogénio resulta na sua oxidação imediata em dímeros-dissulfido [332]. Contudo, a reciclagem posterior do dímero oxidado pelo sistema

tiorredoxina/tiorredoxina redutase, que existe em baixos níveis no GV, ocorre lentamente, levando à acumulação dos dímeros em situações de *stress* [355]. Este facto está na base da acumulação de formas diméricas da PRDX no GV ser considerada um marcador útil e em tempo real de *stress* oxidativo [356]. No entanto, no GV a PRDX 2 é resistente à sobreoxidação, permitindo continuar a atuar como captador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quando a PRDX 2 se torna completamente oxidada, o GV requer a catalase e/ou a peroxidase do glutatião para a remoção do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [355]. Recentemente, alguns autores sugerem um novo papel da PRDX 2 como parte integrante na resposta ao *stress* ao nível da membrana celular dos GV, participando na sua homeostasia e no seu envelhecimento [357]. Assim, atualmente questiona-se se a principal função da PRDX 2 no GV é como peroxidase, sensor do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou *chaperone*.

Para além dos GV, a PRDX 2 também existe noutras células, como as células endoteliais, os monócitos, as células B e T. A PRDX 2 está relacionada com a morte e apoptose celular, produção de ROS, *stress* oxidativo, diferenciação, crescimento e proliferação celular [358]. A PRDX 2 está aumentada na Doença de Alzheimer e no Síndrome de Down [351], bem como nas células pancreáticas quando estimuladas por citocinas e peróxido de hidrogénio, sugerindo a sua implicação na patogénese da diabetes mellitus [359]. Adicionalmente, as PRDX 2 estão também envolvidas na proliferação das células musculares lisas nas lesões aterogénicas [360].

Face ao que foi anteriormente dito, as peroxirredoxinas são sensíveis à oxidação, sendo mesmo consideradas sensores redox, e a presença de peroxirredoxinas oxidadas decorre de alteração na homeostase redox celular. Para Poynton A e Hampton M [361] são várias as características que tornam as peroxirredoxinas num biomarcador do *stress* oxidativo:

- a) são proteínas abundantes e muito reativas, e a oxidação é detetada quando outras modificações redox ainda não o são;
- b) a expressão intracelular variada das diferentes peroxirredoxinas permite explorar a disrupção redox em diferentes compartimentos celulares;
- c) as modificações oxidativas das peroxirredoxinas são reversíveis [362], mas a diferentes velocidades.

Assim, a determinação da oxidação das peroxirredoxinas permitirá monitorizar o *stress* oxidativo e a altura de retorno à homeostasia. Face ao exposto, a monitorização

das PRDX oxidadas pode ser útil para a medição do *stress* oxidativo nos GV em doentes com SAOS.

Neste trabalho de investigação verificou-se que nos doentes com SAOS as formas monoméricas/diméricas da PRDX 2 estavam mais sobreoxidadas no período da manhã em comparação com o período da noite, verificando-se o oposto nos roncadores, e que as formas sobreoxidadas estavam correlacionadas com a gravidade da SAOS e com parâmetros metabólicos (HbA1c, insulina e HOMA-IR) dos doentes. Esta expressão diferencial da PRDX 2 na SAOS fundamenta a hipótese dos GV estarem envolvidos no *stress* oxidativo que ocorre na SAOS, com provável disrupção dos ritmos circadiários eritrocitários, e que a PRDX 2 é uma das enzimas anti-oxidantes fundamentais neste processo. A relação entre as formas sobreoxidadas da PRDX 2 e os parâmetros metabólicos pode ser explicada pelo facto destes últimos estarem também relacionados com a gravidade da SAOS, como demonstrado no estudo 1.

Evidência recente sugere também que os níveis plasmáticos de PRDX 2, sem determinação dos níveis eritrocitários, estão positivamente correlacionados com os triglicéridos [363]. De igual modo, foram descritos maiores níveis plasmáticos das peroxirredoxinas na diabetes sugerindo uma possível resposta adaptativa [364, 365] e a explicação pode residir no facto do compromisso do metabolismo da glucose comprometer a função mitocondrial com aumento da produção de espécies reativas [366]. Neste trabalho, os doentes com SAOS apresentam aumento dos triglicéridos e, apesar de não terem o diagnóstico de diabetes pela existência de compromisso do metabolismo da glucose (insulina e HOMA-IR), pode ser considerada também a existência de um “estado de pré-diabetes”. Esta situação pode explicar também a correlação entre a PRDX 2 sobre-oxidada com os parâmetros metabólicos. No entanto, não existem estudos que incluam a determinação dos níveis da peroxirredoxina nos GV, tornando assim difícil a melhor compreensão das correlações obtidas.

Acresce que após 6 meses de tratamento com PAP ocorreu uma diminuição desta sobreoxidação e foram geradas formas sobreoxidadas multiméricas, as quais se sabe apresentarem atividade de *chaperone*/transdução da sinalização da PRDX 2. Por sua vez, estes multímeros estavam negativamente correlacionados com a glucose em jejum e com os níveis de dopamina urinária. O papel do PAP na atividade simpática e na glucose tem sido debatido na literatura [367, 165], e o estudo 1, apesar de não ter registado alteração das catecolaminas urinárias após 6 meses de PAP, demonstrou

melhoria do metabolismo da glucose após este tratamento. A observação de multímeros aquando do tratamento com PAP, em que é expectável uma melhoria da oxigenação noturna e do stress oxidativo, leva a considerar a possibilidade de aparecimento de outra forma de PRDX 2, agora com uma atividade diferente da atividade de peroxidase (*chaperone*/transdução da sinalização).

Apesar dos condicionalismos, na globalidade, estes resultados apontam para o uso da PRDX 2 como marcador promissor de gravidade da SAOS e de resposta ao tratamento.

---

## Considerações finais

Claramente, e apesar dos avanços científicos, continuam a existir desafios na utilização dos novos conhecimentos no diagnóstico, prognóstico e abordagem terapêutica dos indivíduos com SAOS. As limitações das metodologias analíticas, incluindo as mais recentes, como é o caso da proteômica, estão relacionadas com o curso crónico da doença e a sua associação a consequências cardiometabólicas, o que pode dificultar a validação dos biomarcadores identificados nos coortes de doentes com SAOS. Adicionalmente, várias questões técnicas e metodológicas, sobretudo respeitantes à área da proteômica, incluindo custos e perícia necessária para a validação e processo de qualificação, podem ser fatores limitantes da implementação de tais biomarcadores na prática clínica [368, 369]. Apesar das limitações potenciais destas ferramentas, a identificação de perfis analíticos e proteómicos permanece uma estratégia promissora em termos de estabelecimento de biomarcadores de gravidade e de monitorização terapêutica.

Assim, considera como pontos positivos deste trabalho de investigação os seguintes:

1. **Trabalho de investigação multidisciplinar**, envolvendo a clínica, a bioquímica, a ciência básica e a biologia dos sistemas aplicados à SAOS, tendo contado para tal com um grupo de profissionais em interação, destacando-se o Serviço de Pneumologia e de Patologia Clínica do CHLN e o Laboratório de Proteómica do INSA.
2. Importância da **caracterização cardiometabólica** do doente com SAOS, como meio complementar de prognóstico e de avaliação da resposta ao tratamento com PAP.
3. Importância do **hemograma** na abordagem prognóstica e de resposta ao tratamento do doente com SAOS. Em concreto, o **RDW como parâmetro de**



---

**priorização diagnóstica** dos casos graves e os parâmetros eritrocitários e plaquetários como parâmetros de resposta ao tratamento com PAP.

4. **Análise proteómica do doente adulto com SAOS.** Os estudos de proteómica na SAOS foram realizados em maior número em crianças e a sua utilização em adultos era urgente. Por um lado, porque a criança não é um “adulto pequeno” e, por outro, as etiologias e os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à SAOS na infância diferem dos da idade adulta.
5. Aplicação de diferentes, mas complementares, **tecnologias proteómicas**. Neste trabalho houve a preocupação de proceder à análise proteómica nos GV, mediante as técnicas 2-DIGE/MS e a validação dos resultados por técnicas ortogonais, o que permitiu não só a confirmação dos resultados, como conferiu também maior robustez a esta investigação.
6. **Avaliação do perfil proteómico em diferentes tempos:** durante a noite, imediatamente antes da PSG, e de manhã, imediatamente após esta. Esta decisão foi tomada tendo por base a SAOS ser uma perturbação respiratória que ocorre durante sono e como tal seria expectável que o perfil proteómico diferisse entre estes tempos.
7. Avaliação do perfil proteómico **antes e no decorrer do tratamento com PAP** permitiu considerar que as alterações detetadas estariam muito provavelmente relacionadas com a SAOS e ainda com a vantagem de o doente ter servido de controlo para ele próprio.
8. A **avaliação da modulação da expressão de diferentes** proteínas no GV do doente com SAOS, em particular a PRDX 2, veio elucidar possíveis mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta entidade clínica, apontando para a importância do *stress* oxidativo nestas células. E ainda para o facto da PRDX2 eritrocitária poder ser um biomarcador promissor de gravidade da SAOS e de monitorização ao tratamento.

9. O reforço da importância do compromisso da **oxigenação da SAOS e do stress oxidativo** como paradigmas do processo patológico da SAOS e das suas consequências.
10. **Criação de uma base de dados associada ao primeiro biobanco** de doentes com SAOS em Portugal, o que possibilitará a realização de futuros estudos epidemiológicos, sendo crucial para a validação de biomarcadores num grande coorte de doentes.

Em contrapartida, neste trabalho de investigação considera como limitações os seguintes aspetos:

1. As amostras estudadas têm uma dimensão limitada e os doentes participantes foram selecionados a partir de um centro português de sono, o que contribui para a limitação da generalização dos resultados.
2. Esta investigação apenas incluiu doentes do género masculino, o que impede também a generalização dos resultados. Ainda mais que a expressão das comorbilidades na SAOS difere entre o género masculino e o feminino [337], sendo a diabetes tipo 2 e a doença cardíaca isquémica mais prevalente no primeiro e a HTA e a depressão mais prevalente no segundo. Mesmo tendo em conta esse facto, a exclusão das mulheres teve por base a evicção das influências hormonais.
3. Os roncadores foram considerados como controlos. Apesar desta opção ser tomada na vasta maioria dos estudos envolvendo doentes com SAOS, é necessário salientar que os roncadores são indivíduos não livres de sintomas e cujo risco cardiometabólico, a longo prazo, ainda não está completamente elucidado.
4. A não exclusão de doentes com SAOS com HTA, diabetes e medicação crónica pode ser considerada uma limitação adicional, sobretudo na avaliação dos parâmetros do hemograma.

- 
5. A inclusão de doentes obesos com SAOS tornou difícil clarificar a contribuição da obesidade como causa ou consequência, impossibilitando a total compreensão das vias moleculares subjacentes.
  6. Na caracterização dos doentes relativamente ao metabolismo glicídico, para além da determinação da glicémia, insulina e resistência à insulina, não foi realizado o teste de tolerância oral à glicose, o que poderia revelar diabetes ou compromisso da tolerância à glicose nalguns doentes.
  7. Apesar de ter existido indicação para cumprimento da dieta dos 3 dias, na avaliação das catecolaminas urinárias, os hábitos alimentares não foram controlados e não foi determinado o estado nutricional, nem foram doseadas as vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>11</sub> e B<sub>12</sub>, cujas alterações podiam condicionar os valores do hemograma e dos níveis de homocisteína.
  8. Parte deste trabalho de investigação foi gerado a partir de uma hipótese, que se baseia na existência de um perfil proteómico nos GV dos doentes com SAOS e, como tal, toda a sua dinâmica assentou numa conduta de descoberta.
  9. Dados os custos elevados que comportam as diferentes técnicas proteómicas, o estudo incidiu numa amostra modesta de doentes e numa única proteína. Logo, a generalização dos resultados requererá a extensão da análise proteómica aos restantes doentes que constituem a base de dados e a avaliação das demais proteínas que se encontravam também diferencialmente expressas.

---

## 5.2 CONCLUSÕES

No que concerne aos **objetivos gerais**, o presente trabalho pretendeu investigar numa amostra de doentes com SAOS a existência de biomarcadores de gravidade e de resposta à terapêutica, através da pesquisa direcionada ou convencional e da pesquisa exploratória ou proteómica.

Definiram-se como **objetivos específicos** avaliar nos doentes com SAOS o comportamento de biomarcadores de inflamação, metabólicos e de *stress* oxidativo. Em concreto, pela via convencional pretendeu-se avaliar o comportamento da homocisteína, dos parâmetros glicídicos, lipídicos e do hemograma, e pela via exploratória (proteómica) as proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas e pertencentes às vias de *stress* oxidativo.

Na globalidade este trabalho de investigação permitiu tirar as seguintes conclusões:

**Conclusão 1:** os doentes com SAOS grave podem exibir alterações do perfil glicémico mesmo na ausência de diabetes conhecida e estes parâmetros estão correlacionados com a gravidade da doença. Adicionalmente, a homocisteína, os perfis glicémico e lipídico alteraram-se de forma significativa após 6 meses de tratamento com PAP nos doentes com SAOS grave. Assim, a homocisteína, os perfis glicémico e lipídico e os parâmetros do hemograma são parâmetros com utilidade no estabelecimento da gravidade e da resposta à terapêutica nos doentes com SAOS.

**Conclusão 2:** face à associação positiva entre os valores de RDW e a gravidade da SAOS, este parâmetro pode tornar-se um biomarcador com utilidade na priorização dos doentes com suspeita de SAOS a aguardar PSG. Verificou-se ainda que parâmetros eritrocitários e plaquetários diminuíram de forma considerável após o tratamento com PAP, podendo ser utilizados como biomarcadores de resposta à terapêutica.

**Conclusão 3:** a PRDX2 eritrocitária poderá ser um biomarcador promissor da gravidade da SAOS e da monitorização ao tratamento.

Na globalidade, estes estudos reforçam a noção de que a identificação de biomarcadores, ou possivelmente de *clusters* de biomarcadores, são passos fundamentais na abordagem personalizada ou de precisão dos doentes com SAOS. Porém, só a completa verificação e validação destes parâmetros num maior coorte de doentes poderá traduzir-se numa nova ferramenta de prognóstico/resposta à terapêutica para a SAOS.

### Áreas a desenvolver

Relativamente à investigação exploratória, muito trabalho permanece por fazer até que as alterações proteicas nos doentes com SAOS sejam completamente compreendidas e a sua relevância clínica estabelecida. O uso dos métodos de proteómica na descoberta de biomarcadores na área da medicina do sono ainda está na sua infância, com elevada quantidade de dados a aguardar que sejam descobertos num futuro próximo. Presentemente, os resultados dos estudos que vão surgindo têm limitações e são experimentais, requerendo validação contra os métodos diagnósticos estabelecidos.

Futuros estudos proteómicos devem englobar amostras de doentes de maior dimensão e com a inclusão de ambos os géneros. A análise proteómica deve ser estendida às demais proteínas citosólicas diferencialmente expressas, bem como às proteínas membranares eritrocitárias e às proteínas plasmáticas. Face à complexidade fisiopatológica da SAOS, a descoberta de biomarcadores poderá assentar em *clusters* de proteínas diferencialmente expressas e, como tal, o futuro passará por alargar o leque da pesquisa proteómica.

É desejável/expectável que os novos estudos, possivelmente pela via de investigação exploratória, possam ajudar na compreensão dos mecanismos da doença e das suas complicações, o que se traduzirá em ferramentas de diagnóstico, prognóstico e de avaliação terapêutica, certamente com impacto na abordagem global da doença e na economia para a saúde.

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação só foi possível porque existiu o apoio e a colaboração de **Outros** e, como tal, quero deixar aqui uma palavra de agradecimento, que será curta para expressar na sua plenitude o meu sentimento. Quero agradecer...

À **Professora Doutora Cristina Bárbara**, na qualidade de Orientadora e de Diretora do Serviço de Pneumologia, pelo acompanhamento e orientação da minha atividade científica e assistencial e que se revestiu de especial importância durante este percurso.

Ao **Professor Doutor Palma Reis**, na qualidade de co-Orientador e de Coordenador dos Doutoramentos em Medicina da FCM-UNL, pela orientação da redação da tese e incentivo dado no processo de conclusão e entrega da mesma, que foram preciosos e fundamentais.

À **Professora Doutora Paula Pinto**, na qualidade de co-Orientadora e de Responsável da Unidade de Sono e de Ventilação Não Invasiva, pela disponibilidade e orientação que foram fundamentais na realização deste trabalho de investigação.

À **Professora Doutora Deborah Penque**, na qualidade de co-Orientadora e de Responsável do Laboratório de Proteómica, pelas críticas constantes e o seu papel na área da proteómica.

Ao **Dr. Atul Malhotra**, na qualidade de mentor, pela sua disponibilidade para discussão de ideias e pelas suas sugestões na revisão dos artigos publicados.

Ao **Professor José Pereira** (Consultor em Estatística) pela revisão da análise estatística.

A todos os **coautores** dos estudos realizados pela colaboração no trabalho desenvolvido.

Aos **técnicos de cardiopneumologia** do Laboratório de Sono do CHLN, cuja competência técnica e participação foram basilares para a efetivação deste trabalho de investigação.

Aos **Profissionais do Laboratório de Proteómica** pela forma que me acolheram e pelo seu profissionalismo que foi primordial na avaliação proteómica.

Aos **Enfermeiros** do Serviço de Pneumologia, que, apesar da sua intensa atividade profissional, se mostraram sempre disponíveis. Em especial à **Enfermeira Fátima Caetano** pela sua prestabilidade na colheita de sangue aos doentes participantes, passo essencial nesta investigação.

Ao **peçoal administrativo** do Serviço de Pneumologia que, com um sorriso, sempre tentaram satisfazer as minhas solicitações.

Aos **colegas/amigos** pela compreensão e carinho demonstrados, dando força e coragem para continuar, apesar das dificuldades decorrentes da conciliação entre a atividade clínica e de investigação.

À **minha família** por acreditarem, por apoiarem, por compreenderem e desculparem as minhas ausências, dando sempre amor e coragem desde a conceção à finalização deste doutoramento... Sobretudo, e mais do que tudo, a eles não tenho palavras para expressar o meu profundo MUITO OBRIGADO!

---

**BOLSAS**

Este trabalho de investigação contou com o apoio financeiro das seguintes bolsas:

Bolsa da Sociedade Portuguesa de Pneumologia/Novartis pelo projeto “Padrão proteómico na Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono” (2010).

Fundo da Sociedade Portuguesa de Pneumologia para apoio à Formação, Inovação e Investigação em Pneumologia (2012).

*Harvard Medical School-Portugal Program in Translational Research and Information* financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (HMSP-ICJ/0022/2011) (2012). No âmbito deste programa frequentou o *Summer Program in Clinical Effectiveness* (de 3 de julho a 17 de agosto de 2012) e o *Summer Course* (29 junho a 17 de Agosto de 2013) na *Harvard School of Public Health*, em Boston (Estados Unidos da América).

Apoio financeiro concedido pela Vitalaire, pertencente à Sociedade Portuguesa do Ar Líquido, filial da multinacional Air Liquide (2013).



---

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO DOENTE**

(NOME) \_\_\_\_\_,  
concordo, de forma voluntária, a integrar o projecto de investigação intitulado “Apneia Obstrutiva do Sono e doenças metabólicas e cardiovasculares associadas: compreender mecanismos para um diagnóstico precoce e previsão de prognóstico”.

Declaro que fui informado(a) sobre os objectivos e metodologia deste estudo, bem como sobre as condições de participação, tendo recebido informação oral e escrita, que ouvi, li compreendi.

Este documento foi assinado após o esclarecimento de todas as dúvidas com o Investigador.

Autorizo, igualmente, a utilização dos dados recolhidos, de forma anónima e confidencial, em posteriores projectos de investigação, desde que autorizados pela devida Comissão de Ética.

Assinatura do Participante: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Investigador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

### **Documento Informativo dirigido ao Participante**

A síndrome de apneia obstrutiva do sono (SAOS) consiste num conjunto de sintomas e sinais, que resulta dos episódios recorrentes de obstrução da via aérea superior durante o sono. Tem sido reconhecido que a SAOS não tratada traz consequências a longo prazo, nomeadamente cardiovasculares e metabólicas. Recentemente, estudos proteómicos (análise de grupos de proteínas) têm sido aplicados na avaliação dos mecanismos e vias responsáveis pelas consequências da SAOS.

#### ***Objectivo do Estudo:***

Assim, o objectivo deste estudo é avaliar o padrão analítico e proteómico nos doentes com SAOS e comparar com aquele existente nos doentes que não tenham SAOS, e apresentem apenas roncopatia simples. E no caso dos doentes com SAOS comparar o padrão analítico e proteómico antes e após tratamento com ventilação.

#### ***Crítérios de Participação:***

Podem participar os doentes do género masculino, com idade compreendida entre os 25 e os 60 anos, avaliados na Consulta de Patologia do Sono do Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. – Hospital de Pulido Valente, com a suspeita clínica de roncopatia e de SAOS. Nessa consulta será efectuada uma entrevista clínica, o que permitirá a recolha de vários dados (género, idade, profissão, hábitos pessoais, doenças prévias conhecidas, hábitos medicamentosos, história de roncopatia, sintomas diurnos e nocturnos sugestivos de SAOS). Será também realizado o exame objectivo que avaliará o peso, a altura, o perímetro abdominal, a pressão arterial e a frequência cardíaca, e também será realizado um exame sumário da orofaringe. Todos os doentes preencherão a Escala de Sonolência de Epworth.

#### ***Crítérios de Exclusão:***

Serão excluídos os doentes que trabalhem por turnos, que tenham feito anteriormente tratamento com ventilação (CPAP) e portadores de outra patologia do sono.

#### ***Metodologia:***

Os doentes seleccionados realizarão uma polissonografia diagnóstica no Laboratório do Sono do Hospital de Pulido Valente. Após a noite do estudo, e após um jejum de 12 horas será feita uma colheita de sangue venoso, que será enviada para o Laboratório de Patologia Clínica para determinação laboratorial da glicémia, Hb A1c, insulinémia, função tiroideia, renal e hepática,

perfil lipídico e homocisteinemia. Será colhida urina de 24 horas que permitirá a determinação das catecolaminas urinárias. Será ainda enviada uma outra amostra de sangue venoso para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge I.P. para proceder à análise proteómica. Os doentes com SAOS moderada/grave iniciarão tratamento com ventilador e serão avaliados os mesmos parâmetros clínicos e analíticos ao 1º e 6º mês de tratamento.

Após a conclusão do estudo, e logo que possível, será elaborado um relatório da análise estatística dos resultados e as respectivas conclusões, e posteriormente será elaborado um manuscrito final com vista a publicação.

***Princípios Gerais do Estudo:***

- 1) Serão respeitadas a Lei de protecção de dados pessoais (Lei 67/98 de 26 de Outubro) e a Lei de Informação Genética Pessoal e Informação de Saúde (Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro).
- 2) A sua participação no Estudo é totalmente voluntária.
- 3) Em qualquer altura pode desistir do Estudo sem que a qualidade dos cuidados médicos seja afectada.
- 4) A informação obtida com este Estudo poderá originar publicações científicas, sem prejuízo de perda do anonimato dos Participantes.
- 5) No decorrer do Estudo poderá colocar, ao Investigador, questões que achar conveniente.
- 6) Este estudo não lhe acarreta qualquer custo do ponto de vista financeiro.
- 7) O estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e do Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E. - Hospital Pulido Valente.

**Contacto:** Amélia Feliciano

Unidade de Fisiopatologia Respiratória

Laboratório do Sono

Hospital de Pulido Valente – Centro Hospitalar Lisboa Norte E.P.E.

Telefone: 21 754 8000

---

**BIBLIOGRAFIA**

A pesquisa bibliográfica foi feita mediante a leitura de livros na área do sono e da proteômica e mediante a pesquisa sistemática de artigos publicados nas revistas científicas de maior relevo nestas áreas, selecionando os artigos mais atuais e privilegiando as diretrizes das associações internacionais.

A pesquisa de artigos foi realizada na base de dados internacional *Medline/PubMed* usando as palavras-chave *obstructive sleep apnea, obesity, insulin resistance, HOMA-IR, diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease; hemogram, RDW, CPAP; biomarkers; inflammation; oxidative stress; proteomic; two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry e peroxiredoxin*.

As referências bibliográficas desta dissertação cumprem os critérios da Revista *Sleep Medicine*.

1. Léger D, Poursain B, Neubauer D, et al. An international survey of sleeping problems in the general population. *Curr Med Res Opin* 2008; 24(1): 307-317.
2. Ohayon M. Prévalence et comorbidité des troubles du sommeil dans la population générale. *Rev Prat* 2007; 57: 1521-1528.
3. (AASM) American Academy of Sleep Medicine (2014). International Classification of Sleep Disorders, 3<sup>rd</sup> ed, Darien, IL 2014.
4. Kryger M. Sleep apnea. From the needles of Dionysius to continuous positive airway pressure. *Arch Intern Med* 1983; 143: 2301-2303.
5. Saddichha S. Diagnosis and treatment of chronic insomnia. *Ann Indian Acad Neurol* 2010; 13 (2):94-102.
6. Young T, Palta M, Dempsey J, et al. The occurrence of Sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Eng J Med* 1993; 328: 1230-1235.
7. Young T, Evans L, Finn L, et al. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome among middle-aged men and women *Sleep* 1997; 20:705-706.

8. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Ver* 2015; 20: 27-45.
9. Punjabi N. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 136-143.
10. Franklin K, Lindberg E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-a review on the epidemiology of sleep apnea. *J. Thorac. Dis* 2015; 7 (8): 1311–1322.
11. Heinzer R, Vat S, Marques-Vidal P, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015, 3(4), 310–318.
12. Senaratna C, Perret J, Lodge C, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea in the general population: A systematic review. *Sleep Med Rev* 2016 Jul 18. pii: S1087-0792(16)30064-8.
13. Teixeira J. Síndrome de apneia/hipopneia obstrutiva do sono – Um problema de saúde pública? Pertinência da gestão integrada da doença para a sua abordagem na comunidade. Julho de 2006. Tese de Mestrado no âmbito do 7º Curso de Mestrado em Saúde Pública, organizado pela Escola Nacional de Saúde Pública. Universidade Nova de Lisboa.
14. Rodrigues A, Pinto P, Nunes B, et al. Obstructive Sleep Apnea: Epidemiology and Portuguese patients profile. *Rev Port Pneumol* 2017; 23(2):57-61.
15. Duran J, Esnaola S, Rubio R, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163: 685-689.
16. Miguel-Díez J, Carrasco-Garrido P, Jiménez-García R, et al. Obstructive sleep apnea among hospitalized patients in Spain, analysis of hospital discharge data 2008-2012. *Sleep Breath* 2015; 19(3): 841-848.
17. Singh M, Liao P, Kobah S, et al. Proportion of surgical patients with undiagnosed obstructive sleep apnoea. *Br J Anaesth* 2013; 110: 629-636.
18. Steier J, Martin A, Harris J, et al. Predicted relative prevalence estimates for obstructive sleep apnoea and the associated healthcare provision across the UK. *Thorax* 2014; 69: 390-922.

19. Eckert D, White D, Jordan A, et al. Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea. Identification of novel therapeutic targets. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 996–1004.
20. Edwards BA et al, 2016 - Edwards B, Eckert D, Jordan A. Obstructive sleep apnoea pathogenesis from mild to severe: Is it all the same? *Respirology* 2016, 22: 33–42.
21. Franco I, Reis R, Ferreira D, et al. The impact of neck and abdominal fat accumulation on the pathogenesis of obstructive sleep apnea. *Portuguese Journal of Pulmonology* 2016; 22 (4): 240-242.
22. Johansson K, Hemmingsson E, Harlid R et al. Longer term effects of very low energy diet on obstructive sleep apnoea in cohort derived from randomised controlled trial: prospective observational follow-up study. *BMJ* 2011; 342: d3017.
23. Yagi H, Nakata S, Tsuge H, et al. Morphological examination of upper airway in obstructive sleep apnea *Auris Nasus Larynx* 2009; 36(4): 444-449.
24. Wysocki J, Krasny M, Prus M. Morphological predictors of sleep apnoea severity. *Folia Morphol (Warsz)* 2015 Sep 14.
25. Tufik S, Silva R, Taddei J, et al. Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the São Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine* 2010; 11: 441-446.
26. Aguiar I, Freitas W, Santos I, et al. Obstructive sleep apnea and pulmonary function in patients with severe obesity before and after bariatric surgery: a randomized clinical trial. *Multidiscip Respir Med* 2014; 9: 43.
27. Zinchuk A, Gentry M, Concato J, et al. Phenotypes in obstructive sleep apnea: A definition, examples and evolution of approaches. *Sleep Med Rev.* 2016 Oct 12.
28. Rowley J, Aboussouan L, Badr M. The use of clinical prediction formulas in the evaluation of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2000; 23: 929-938.
29. Rosen C, Auckley D, Benca R, et al. A multisite randomized trial of portable sleep studies and positive airway pressure autotitration versus laboratory-based polysomnography for the diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea: the HomePAP study. *Sleep* 2012; 35: 757-767.
30. Chesson A, Berry R, Pack A. Practice parameters for the use of portable monitoring devices in the investigation of suspected obstructive sleep apnea in adults. *Sleep* 2003; 26 (7):907-913.
31. Collop N, Anderson W, Boehlecke B, et al. Clinical guidelines for the use of unattended portable monitors in the diagnosis of obstructive sleep apnea in adult

- patients: Portable Monitoring Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 2007; 3: 737-747.
32. Kapur V, Auckley D, Chowdhuri S, et al. Clinical practice guideline for diagnostic testing for adult obstructive sleep apnea: an American Academy of Sleep Medicine clinical practice guideline. *J Clin Sleep Med* 2017; 13(3): 479–504.
33. Epstein L, Kristo D, Strollo P, et al. Adult, Obstructive Sleep Apnea Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med* 2009; 5(3): 263-276.
34. Qaseem A, Dallas P, Owens D, et al. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2014, 161, 3:210–220.
35. Abrishami A, Khajehdehi A, Chung F. A systematic review of screening questionnaires for obstructive sleep apnea. *Can J Anaesth* 2010; 57: 423-438.
36. Rodrigues A, Pinto P, Nunes B, et al. Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Um estudo da Rede Médicos-Sentinela. INSA, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.18/2686>.
37. Kuna S, Badr M, Kimoff R, et al. An official ATS/AASM/ACCP/ERS workshop report: research priorities in ambulatory management of adults with obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8: 1-16.
38. Masa J, Corral J, Pereira R, et al. Effectiveness of home respiratory polygraphy for the diagnosis of sleep apnoea and hypopnoea syndrome. *Thorax* 2011; **66**: 567-573.
39. Park D, Shin C, Hong S, et al. Correlation between the severity of obstructive sleep apnea and heart rate variability indices. *J Korean Med Sci* 2008; 23(2): 226-231.
40. Pépin J, Tamisier R, Borel J, et al. A critical review of peripheral arterial tone and pulse transit time as indirect diagnostic methods for detecting sleep disordered breathing and characterizing sleep structure. *Curr Opin Pulm Med* 2009; 15(6): 550-8.
41. Collop N, Tracy S, Kapur V, et al. Obstructive Sleep Apnea Devices for Out-Of-Center (OOC) Testing: Technology Evaluation. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2011; 7(5): 531-548.



42. Yalamanchali S, Farajian V, Hamilton C, et al. Diagnosis of obstructive sleep apnea by peripheral arterial tonometry: meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139(12): 1343-50.
43. Masa J, Duran-Cantolla J, Capote F, et al. Effectiveness of Home Single-Channel Nasal Pressure for Sleep Apnea Diagnosis. *Sleep* 2014; 37(12): 1953-1961.
44. Roebuck A, Clifford G. Comparison of Standard and Novel Signal Analysis Approaches to Obstructive Sleep Apnea Classification. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2015; 3: 114.
45. Atri R, Mohebbi M. Obstructive sleep apnea detection using spectrum and bispectrum analysis of single-lead ECG signal. *Physiol Meas* 2015 Sep 2; 36(9): 1963-1980.
46. McNicholas W. Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 154-160.
47. De Chazal P, Fox N, O'Hare E, et al. Sleep/wake measurement using a non-contact biomotion sensor. *J Sleep Res* 2011; 20: 356-366.
48. Berry R, Hill G, Thompson L, McLaurin V. Portable monitoring and autotitration versus polysomnography for the diagnosis and treatment of sleep apnea. *Sleep* 2008; 31(10):1423-1431.
49. Colten H, Altevogt B: ed. lit. Sleep disorders and sleep deprivation: an unmet public health problem. Washington: National Academies Press, 2006.
50. Jennum P, Kjellberg J. Health, social and economical consequences of sleep-disordered breathing: a controlled national study. *Thorax* 2011; 66: 560-566.
51. Jennum P, Ibsen R, Kjellberg J. Morbidity prior to a diagnosis of sleep-disordered breathing: a controlled national study. *J Clin Sleep Med* 2013; 9: 103-108.
52. Knauert M, Naik S, Gillespie M, Kryger M. Clinical consequences and economic costs of untreated obstructive sleep apnea syndrome. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2015; 1:17-27.
53. Tarasiuk A, Reuveni H. The economic impact of obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19: 639-644.
54. Jackson M, Howard M, Barnes M. Cognition and day time functioning in sleep-related breathing disorders. *Prog Brain Res* 2011; 190: 53-68.
55. Lal C, Strange C, Bachman D. Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea. *Chest* 2012; 141(6): 1601-1610.

- 
56. Bucks R, Olaithe M, Eastwood P. Neurocognitive function in obstructive sleep apnoea: a meta-review. *Respirology* 2013; 18: 61-70.
  57. Rosenzweig I, Glasser M, Polsek D, et al. Sleep apnoea and the brain: a complex relationship. *Lancet Respir Med* 2015; 3: 404-414.
  58. Ho M, Brass S. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int* 2011; 3: e15.
  59. Tregear S, Reston J, Schoelles K, et al. Obstructive sleep apnea and risk of motor vehicle crash: systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med* 2009; 5: 573-581.
  60. Karimi M, Hedner J, Häbel H, et al. Sleep apnea-related risk of motor vehicle accidents is reduced by continuous positive airway pressure: Swedish Traffic Accident Registry data. *Sleep* 2015; 38: 341-349.
  61. Yaffe K, Laffan A, Harrison S, et al. 2011. Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *JAMA* 306: 613–619.
  62. Molnar M, Mucsi I, Novak M, et al. Association of incident obstructive sleep apnea with outcomes in a large cohort of US veterans. *Thorax* 2015; 70: 888-895.
  63. Lattimore J et al, 2003 - Lattimore J, Celermajer D, Wilcox I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1429-1437.
  64. Bradley T, Floras J, 2009 - Bradley T, Floras J. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 2009; 373: 82-93.
  65. Marin J, Agustí A, Villar I, et al. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension. *JAMA* 2012; 307: 2169-2176.
  66. Parati G, Lombardi C, Hedner J, et al. Recommendations for the management of patients with obstructive sleep apnoea and hypertension. *Eur Respir J* 2013; 41: 523–538.
  67. Seif F, Patel S, Walia H, et al. Obstructive sleep apnea and diurnal nondipping hemodynamic indices in patients at increased cardiovascular risk. *J Hypertens* 2014; 32: 267– 275.
  68. Drager L, Genta P, Pedrosa R, et al. Characteristics and predictors of obstructive sleep apnea in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 2010; 105: 1135-1139.

- 
69. Walia H, Li H, Rueschman M, et al. Association of severe obstructive sleep apnea and elevated blood pressure despite antihypertensive medication use. *J Clin Sleep Med* 2014; 10: 835-43.
  70. Gottlieb D, Yenokyan G, Newman A, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 2010; 122: 352-360.
  71. Peker Y, Carlson J, Hedner J. Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a longterm follow-up. *Eur Respir J* 2006; 28: 596-602.
  72. Shah N, Yaggi H, Concato J, et al. Obstructive sleep apnea as a risk factor for coronary events or cardiovascular death. *Sleep Breath* 2010; 14(2): 131-136.
  73. Namtvedt S, Randby A, Einvik G, et al. Cardiac arrhythmias in obstructive sleep apnea (from the Akershus Sleep Apnea Project). *Am J Cardiol* 2011; 108: 1141-1146.
  74. Patel N, Donahue C, Shenoy A, et al. Obstructive sleep apnea and arrhythmia: A systemic review. *Int J Cardiol* 2016; 9 (228):967-970.
  75. Simonneau G, Gatzoulis M, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25 Suppl): D34-41.
  76. Yaggi H, Concato J, Kernan W, et al. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med* 2005; 353: 2034-2041.
  77. Redline S, Yenokyan G, Gottlieb D, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 269-277.
  78. Yaranov D, Smyrlis A, Usatii N, et al. Effect of obstructive sleep apnea on frequency of stroke in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2015; 115(4): 461-465.
  79. Doherty L, Kiely J, Swan V, et al. Longterm effects of nasal continuous positive airway pressure therapy on cardiovascular outcomes in sleep apnea syndrome. *Chest* 2005; 127: 2076–2084.
  80. Lavie P, Lavie L, Herer P. All-cause mortality in males with sleep apnoea syndrome: declining mortality rates with age. *Eur Respir J* 2005; 25: 514–520.
  81. Marin J, Carrizo S, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous

- positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365 (9464): 1046-1053.
82. Punjabi N, Caffo B, Goodwin J, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med* 2009; 6:e1000132.
83. Martínez-García M, Campos-Rodríguez F, Catalán-Serra P, et al. Cardiovascular mortality in obstructive sleep apnea in the elderly: role of long-term continuous positive airway pressure treatment: a prospective observational study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 909.
84. Gami A et al, 2013 - Gami A, Olson E, Shen W, et al. Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62 (7):610.
85. Kuniyoshi F et al, 2010 - Kuniyoshi F, Pusalavidyasagar S, Singh P, et al. Cardiovascular consequences of obstructive sleep apnoea. *Indian J Med Res* 2010; 131: 196-205.
86. Mansukhani M, Bellolio M, Kolla B, et al. Worse outcome after stroke in patients with obstructive sleep apnea: an observational cohort study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011; 20: 401-405.
87. Sahlin C, Sandberg O, Gustafson Y, et al. Obstructive sleep apnea is a risk factor for death in patients with stroke: a 10-year follow-up. *Arch Intern Med* 2008; 168: 297-301.
88. Ryan S, Crinion S, McNicholas W. Obesity and sleep-disordered breathing--when two 'bad guys' meet. *QJM* 2014; 107: 949-54.
89. Bao G Bao, Guilleminault C. Obstructive sleep apnea syndromes in *Clinical Neurophysiology of Sleep Disorders. Handbook of Clinical Neurophysiology*; vol 6, 2005.
90. Nadeem R, Singh M, Nida M, et al. Effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta regression analysis. *J Clin Sleep Med* 2014; 10: 475-489.
91. Barceló A, Piérola J, de la Peña M et al. Free fatty acids and the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal* 2011; 37 (6): 1418-1423.

- 
92. Kawano Y, Tamura A, Kadota J. Association between the severity of obstructive sleep apnea and the ratio of low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol. *Metabolism* 2012; 61: 186-192.
  93. Karkinski D, Georgievski O, Dzekova-Vidimliski P, et al. Obstructive Sleep Apnea and Lipid Abnormalities Open Access Maced J Med Sci 2017; 5(1): 19–22.
  94. Tan K, Chow W, Lametal J, et al. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis* 2006; 184 (2): 377-382.
  95. Pallayova M, Steele K, Magnuson T, et al. Sleep apnea predicts distinct alterations in glucose homeostasis and biomarkers in obese adults with normal and impaired glucose metabolism. *Cardiovascular Diabetology* 2010, 9:83-93.
  96. Steiropoulos P, Papanas N, Bouros D, et al. Obstructive sleep apnea aggravates glycemic control across the continuum of glucose homeostasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 286.
  97. Punjabi N, Beamer B. Alterations in Glucose Disposal in Sleep-disordered Breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 235-240.
  98. Kent B, Grote L, Ryan S, et al. Diabetes mellitus prevalence and control in sleep disordered breathing: the European Sleep Apnea Cohort (ESADA) study. *Chest* 2014; 146 (4): 982-990.
  99. Nagayoshi M, Punjabi N, Selvin E, et al. Obstructive sleep apnea and incident type 2 diabetes. *Sleep Med* 2016; 25: 156-161.
  100. Xu S, Wan Y, Xu M, et al. The association between obstructive sleep apnea and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine* 2015; 15: 105-116.
  101. Kono M, Tatsumi K, Saibara T, et al. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest* 2007; 131: 1387-1392.
  102. Qian Y, Xu H, Wang Y, et al. Obstructive sleep apnea predicts risk of metabolic syndrome independently of obesity: a meta-analysis. *Archives of Medical Science : AMS* 2016; 12(5): 1077-1087.
  103. Coughlin S, Mawdsley L, Mugarza J, et al. Obstructive sleep apnoea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur Heart J* 2004; 25 (9): 735-741.

- 
104. Vgontzas A, Bixier E, Chrousos G. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 211-224.
  105. Korcarz C, Stein J, Peppard P, et al. Combined effects of sleep disordered breathing and metabolic syndrome on endothelial function: the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Sleep* 2014; 37(10): 1707-1713.
  106. Sookoian S, Pirola C. Obstructive sleep apnea is associated with fatty liver and abnormal liver enzymes: a meta-analysis. *Obes Surg* 2013; 23: 1815–1825.
  107. Fleischmann G, Fillafer G, Matterer H, et al. Prevalence of chronic kidney disease in patients with suspected sleep apnoea. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 181–186.
  108. Chou Y, Lee P, Yang C, et al. Obstructive sleep apnea: a standalone risk factor for chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2244–2250.
  109. Canales M, Paudel M, Taylor B, et al. Sleep-disordered breathing and urinary albumin excretion in older men. *Sleep Breath* 2011; 15: 137–144.
  110. Yildiz F, Tezer F, Saygi S. Temporal lobe epilepsy a predisposing factor for sleep apnea: A questionnaire study in video-EEG monitoring unit. *Epilepsy Behav* 2015; 48: 1-3.
  111. Šarníková Z, Kollár B, Šiarník P, et al. Sleep disorders in patients with multiple sclerosis. *J Clin Sleep Med* 2015; 11(5): 553-557.
  112. Chiu Y, Hu H, Lee F, et al. Tension-type headache associated with obstructive sleep apnea: a nation wide population-based study. *J Headache Pain* 2015; 16: 34.
  113. Gupta MA, Simpson FC, 2015 - Gupta M, Simpson F. Obstructive sleep apnea and psychiatric disorders: a systematic review. *J Clin Sleep Med* 2015; 11: 165-175.
  114. Luyster F, Buysse D, Strollo P. Comorbid insomnia and obstructive sleep apnea: challenges for clinical practice and research. *J of Clin Sleep Med* 2010; 6(2): 196-204.
  115. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia M, Martinez M, et al. Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter Spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 99-105.
  116. Dewan N, Nieto F, Somers V. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest* 2015; 147: 266-274.
  117. Crinion S, McNicholas W. Sleep-related disorders in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med* 2014; 8: 79-88.

- 
118. Madama D, Silva A, Matos M. Overlap syndrome - asthma and obstructive sleep apnea. *Rev Port Pneumol* 2016; 22: 6-10.
  119. Kaw R, Chung F, Pasupuleti V, et al. Meta-analysis of the association between obstructive sleep apnoea and postoperative outcome. *Br J Anaesth* 2012; 109: 897–906.
  120. Gaddam S, Gunukula S, Mador M. Post-operative outcomes in adult obstructive sleep apnea patients undergoing non-upper airway surgery: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath* 2014; 18: 615–633.
  121. Cruz I, Drummond M, Winck J. Obstructive sleep apnea symptoms beyond sleepiness and snoring: effects of nasal APAP therapy. *Sleep Breath* 2012; 16: 361-366.
  122. Gunbatar H, Sertogullarindan B, Ekin S, et al. The correlation between red blood cell distribution width levels with the severity of obstructive sleep apnea and carotid intima media thickness. *Med Sci Monit* 2014; 20: 2199-2204.
  123. AlGhanim N, Comondore V, Fleetham J, et al. The economic impact of obstructive sleep apnea. *Lung* 2008, 186(1):7-12.
  124. Banno K, Ramsey C, Walld R, et al. Expenditure on health care in obese women with and without sleep apnea. *Sleep* 2009; 32: 247-252.
  125. Kapur V, Alfonso-Cristancho R. Just a good deal or truly a steal? Medical cost savings and the impact on the cost-effectiveness of treating sleep apnea. *Sleep* 2009; 32(2):135-136.
  126. Qaseem A, Holty J-E, Owens D, et al. The Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Management of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2013; 159: 471-483.
  127. Strollo P, Soose R, Maurer J, et al. Upper-airway stimulation for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014; 370:139-149.
  128. Woodson B, Soose R, Gillespie M, et al. Three-Year Outcomes of Cranial Nerve Stimulation for Obstructive Sleep Apnea: The STAR Trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 154(1):181-188.
  129. Colrain I, Black J, Siegel L, et al. A multicenter evaluation of oral pressure therapy for the treatment of obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2013; 14: 830-837.



- 
130. Berry R, Kryger M, Massie C. A novel nasal expiratory positive airway pressure (EPAP) device for the treatment of obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Sleep* 2011; 34: 479-485.
  131. Sullivan C, Issa F, Berthon-Jones M, et al. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1981; 1: 862-865.
  132. Drummond M, Sculpher M, Torrance G, et al. Methods for the economic evaluation of health care programmes, 3rd edition. Oxford: Oxford University Press; 2005.
  133. Direção-Geral de Saúde. Cuidados Respiratórios Domiciliários: Prescrição de Ventiloterapia e outros equipamento. In: Direção-Geral de Saúde, ed 022/2011. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0222011-de-28092011.aspx>, atualização em 11/9/2015:15.
  134. Rotenberg B, Murariu D, Pang K. Trends in CPAP adherence over twenty years of data collection: a flattened curve. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 2016; 45:43.
  135. Weaver T, Mancini C, Maislin G, et al. Continuous positive airway pressure treatment of sleepy patients with milder obstructive sleep apnea: results of the CPAP Apnea Trial North American Program (CATNAP) randomized clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 677-683.
  136. Canessa N, Castronovo V, Cappa S, et al. Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1419-1426.
  137. Schwartz D, Karatinos G. For individuals with obstructive sleep apnea, institution of CPAP therapy is associated with an amelioration of symptoms of depression which is sustained long term. *J Clin Sleep Med* 2007; 3(6): 631-635.
  138. Tregear S, Reston J, Schoelles K, et al. Continuous positive airway pressure reduces risk of motor vehicle crash among drivers with obstructive sleep apnea: systematic review and meta-analysis. *Sleep* 2010; 33(10): 1373-1380.
  139. Barbé F, Durán-Cantolla J, Sánchez-de-la-Torre M, et al. Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012; 307: 2161-2168.

- 
140. Montesi S, Edwards B, Malhotra A, et al. The effect of continuous positive airway pressure treatment on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Sleep Med* 2012; 8: 587–596.
  141. Iftikhar I, Valentine C, Bittencourt L, et al. Effects of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Hyperten* 2014; 32: 2341–2350.
  142. Kasai T, Narui K, Dohi T, et al. Prognosis of patients with heart failure and obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. *Chest* 2008; 133: 690-696.
  143. Damy T, Margarit L, Noroc A, et al. Prognostic impact of sleep-disordered breathing and its treatment with nocturnal ventilation for chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 1009-1019.
  144. Sajkov D, McEvoy RD. Obstructive sleep apnea and pulmonar hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2009; 51(5): 363-370.
  145. Milleron O, Pilliere R, Foucher A, et al. Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur Heart J* 2004; 25: 728-734.
  146. Colish J, Walker J, Elmayergi N, et al. Obstructive sleep apnea: effects of continuous positive airway pressure on cardiac remodeling as assessed by cardiac biomarkers, echocardiography, and cardiac MRI. *Chest* 2012; 141: 674-681.
  147. Fein A, Shvilkin A, Shah D, et al. Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: 300-305.
  148. Naruse Y, Tada H, Satoh M, et al. Concomitant obstructive sleep apnea increases the recurrence of atrial fibrillation following radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation: clinical impact of continuous positive airway pressure therapy. *Heart Rhythm* 2013; 10: 331-337.
  149. McEvoy R, Antic N, Heeley E, et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med* 2016; 375: 919-931.
  150. Parra O, Sánchez-Armengol A, Bonnin M, et al. Early treatment of obstructive apnoea and stroke outcome: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2011; 37(5): 1128-1136.

- 
151. Minnerup J, Ritter M, Wersching H, et al. Continuous positive airway pressure ventilation for acute ischemic stroke: a randomized feasibility study. *Stroke* 2012; 43: 1137-1139.
  152. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia M, de la Cruz-Moron I, et al. Cardiovascular mortality in women with obstructive sleep apnea with or without continuous positive airway pressure treatment: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012; 156 (2): 115-122.
  153. Sivam S, Phillips C, Trenell M, et al. Effects of 8 weeks of continuous positive airway pressure on abdominal adiposity in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012;40:913-918.
  154. Kritikou I, Basta M, Tappouni R, et al. Sleep apnoea and visceral adiposity in middle-aged male and female subjects. *Eur Respir J* 2013;41:601-609.
  155. Drager L, Brunoni A, Jenner R, et al. Effects of CPAP on body weight in patients with obstructive sleep apnoea: a meta-analysis of randomised trials. *Thorax* 2015; 70(3): 258-264.
  156. Steiropoulos P, Tsara V, Nena E, et al. Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest* 2007; 132(3): 843-851.
  157. Sharma S, Agrawal S, Damodaran D, et al. CPAP for the metabolic syndrome in patients with obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2011; 365: 2277–2286.
  158. Keenan B, Maislin G, Sunwoo B, et al. Obstructive sleep apnoea treatment and fasting lipids: a comparative effectiveness study. *Eur Respir J* 2014; 44: 405-414.
  159. Kohler M, Stoewhas A, Ayers L, et al. Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 1192-1199.
  160. Borgel J, Sanner B, Bittlinsky A, et al. Obstructive sleep apnoea and its therapy influence high-density lipoprotein cholesterol serum levels. *Eur Respir J* 2006; 27: 121–127.
  161. Nadeem R, Singh M, Nida M, et al. Effect of CPAP treatment for obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on lipid profile: a meta-regression analysis. *Lancet* 2014; 383: 736–747.
  162. Surani S, Subramanian S. Effect of continuous positive airway pressure therapy on glucose control. *World J Diabetes* 2012; 3(4): 65-70.

- 
163. Dorkova Z, Petrasova D, Molcanyiova A, et al. Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular risk profile in patients with severe obstructive sleep apnea and metabolic syndrome. *Chest* 2008; 134: 686–692.
  164. Chen L, Pei J, Chen H. Effects of continuous positive airway pressure treatment on glycaemic control and insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2014; 10: 637–642.
  165. Martínez-Ceron E, Fernández-Navarro I, Garcia-Rio F. Effects of continuous positive airway pressure treatment on glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Med Rev*, 2016; 25: 121-130.
  166. Feng Y, Zhang Z, Dong Z. Effects of continuous positive airway pressure therapy on glycaemic control, insulin sensitivity and body mass index in patients with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes: a systemic review and meta-analysis. *NPJ Prim Care Respir Med* 2015; 25:15005.
  167. Iftikhar I, Khan M, Das A, et al. Meta-analysis: Continuous Positive Airway Pressure Improves Insulin Resistance in Patients with Sleep Apnea without Diabetes. *Annals of the American Thoracic Society* 2013; 10 (2): 115-120.
  168. Yang D, Liu Z, Yang H, et al. Effects of continuous positive airway pressure on glycemic control and insulin resistance in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath* 2013; 17: 33–38.
  169. West S, Nicoll D, Wallace T, et al. Effect of CPAP on insulin resistance and HbA1c in men with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes. *Thorax* 2007; 62: 969-974.
  170. Hecht L, Mohler R, Meyer G. Effects of CPAP-respiration on markers of glucose metabolism in patients with obstructive sleep apnoea syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ger Med Sci* 2011; 9: Doc20.
  171. Weinstock T, Wang X, Rueschman M, et al. A controlled trial of CPAP therapy on metabolic control in individuals with impaired glucose tolerance and sleep apnea. *Sleep* 2012; 35: 617-625B.
  172. Jullian-Desayes I, Joyeux-Faure M, Tamisier R, et al. Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 2014; 31: S1087–S1092.

- 
173. Gallegos L, Dharia T, Gadegbeku A. Effect of continuous positive airway pressure on type 2 diabetes mellitus and glucose metabolism. *Hosp Pract* (1995) 2014; 42: 31–37.
  174. Grimaldi D, Beccuti G, Touma C, Van CE, Mokhlesi B, et al. Association of obstructive sleep apnea in rapid eye movement sleep with reduced glycemic control in type 2 diabetes: therapeutic implications. *Diabetes Care*. 2014; 37: 355–363.
  175. Chen L, Kuang J, Pei J, et al. Continuous positive airway pressure and diabetes risk in sleep apnea patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med* 2017; 39: 39–50.
  176. Tasali E, Ip M. Obstructive sleep apnea and metabolic syndrome: alterations of glucose metabolism and inflammation. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 207-217.
  177. McNicholas WT. Cardiovascular outcomes of CPAP therapy in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1666-R1670.
  178. Oyama J, Yamamoto H, Maeda T, et al. Continuous positive airway pressure therapy improves vascular dysfunction and decreases oxidative stress in patients with the metabolic syndrome and obstructive sleep apnea syndrome. *Clin. Cardiol* 2012; 35, 4: 231–236.
  179. Baessler A, Nadeem R, Harvey M, et al. Treatment for sleep apnea by continuous positive airway pressure improves levels of inflammatory markers – a meta-analysis. *J Inflamm* 2013; 10: 13–16.
  180. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome: an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 35-51.
  181. Eltzschig H, Eckle T. Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17: 1391-1401.
  182. Dempsey J, Veasey S, Morgan B, et al. Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev* 2010; 90(1): 47–112.
  183. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia – Revisited- The bad, ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Medicine Reviews* 2014; 30: 1-19.
  184. Prabhakar N, Peng Y, Kumar G, et al. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr Physiol* 2015; 5(2): 561–577.

- 
185. Konecny T, Kara T, Somers V. Obstructive apnea and hypertension: an update. *Hypertension* 2014; 63(2): 203–209.
  186. Floras J. Sleep apnea and cardiovascular risk. *J Cardiol* 2014; 63(1): 3–8.
  187. Comondore V, Cheema R, Fox J, et al. The impact of CPAP on cardiovascular biomarkers in minimally symptomatic patients with obstructive sleep apnea: a pilot feasibility randomized crossover trial. *Lung* 2009; 187(1): 17–22.
  188. Tasali E, Chapotot F, Leproult R, et al. Treatment of obstructive sleep apnea improves cardiometabolic function in young obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(2):365– 374.
  189. Hakim F, Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Sympathetic and catecholaminergic alterations in sleep apnea with particular emphasis on children. *Front Neurol* 2012; 3:7.
  190. Weidinger A, Kozlov A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 2015, 5: 472-484.
  191. Stocker R, Keaney Jr J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478.
  192. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 3905-3932.
  193. Cai Z, Yan L. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health. *J Biochem Pharmacol Res* 2013; 1:15-26.
  194. Kehrer J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149(1): 43-50.
  195. Johansen J, Harris A, Rychly D, et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4: 5.
  196. Jordan W, Berger C, Cohrs S, et al. CPAP-therapy effectively lowers serum homocysteine in obstructive sleep apnea syndrome. *J Neural Transm* 2004; 111(6): 683-689.
  197. Lavie L. Sleep-disordered breathing and cerebrovascular disease: A mechanistic approach. *Neurol Clin* 2005; 23: 1059-1075.

198. Suzuki Y, Jain V, Park A, et al: Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1683-1692.
199. Ntalapascha M, Makris D, Kyparos A, et al. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath* 2013; 17: 549-555.
200. Lavie L. Oxidative stress inflammation and endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Frontiers in Bioscience* 2012; 4: 1391-1403.
201. Eisele H-J, Markart P, Schulz R. Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Cardiovascular Disease: Evidence from Human Studies. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 608438.
202. Reuter S, Gupta S, Chaturvedi M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603-1616.
203. Nieto F, Peppard P, Young T, et al. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin sleep cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 190-194.
204. Cao J, Feng J, Li L, et al. Obstructive sleep apnea promotes cancer development and progression: a concise review. *Sleep Breath* 2015; 19, 2: 453–457.
205. Christou K, Markoulis N, Moulas A, et al. Reactive oxygen metabolites (ROMs) as an index of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath* 2003; 7(3): 105-110.
206. Barceló A, Barbé F, de la Peña M, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J* 2006; 27: 756-760.
207. Cofta S, Wysocka E, Michalak S, et al. Endothelium-derived markers and antioxidant status in the blood of obstructive sleep apnea males. *European Journal of Medical Research* 2009; 14 (supplement 4): 49-52.
208. Baysal E, Taysi S, Aksoy N, et al. Serum paraoxonase, arylesterase activity and oxidative status in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2012; 16 (6): 770-774.
209. Sales L, Bruin V, D’Almeida V, et al. Cognition and biomarkers of oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Clinics* 2013; 68(4):449-455.

- 
210. Asker S, Asker M, Sarikaya E, et al. Oxidative stress parameters and their correlation with clinical, metabolic and polysomnographic parameters in severe obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(7): 11449-11455.
  211. Takahashi K, Chin K, Nakamura H, et al. Plasma thioredoxin, a novel oxidative stress marker, in patients with obstructive sleep apnea before and after nasal continuous positive airway pressure. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10 (4): 715-26.
  212. Guo Q, Wang Y, Li Q, et al. Levels of thioredoxin are related to the severity of obstructive sleep apnea: based on oxidative stress concept. *Sleep Breath* 2013; 17 (1): 311-316.
  213. Passali D, Corallo G, Yaremchuk S, et al. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *ACTA otorhinolaryngologica italica* 2015; 35: 420-425.
  214. Öztürka L, Mansour B, Yüksel M, et al. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clinica Chimica Acta* 2003; 332: 83-88.
  215. Svatikova A, Wolk R, Lerman L, et al. Oxidative stress in obstructive sleep apnoea. *Eur Heart J* 2005; 26: 2435-2439.
  216. Alzoghaibi M, Bahammam A. Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: a pilot study. *Sleep Breath* 2005; 9: 119-126.
  217. Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, et al. The effects of 1-year treatment with a herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 2007; 131: 740-749.
  218. Dal-Fabbro C, Garbuio S, D'Almeida V, et al. Mandibular advancement device and CPAP upon cardiovascular parameters in OSA. *Sleep Breath* 2014; 18(4): 749-759.
  219. Celec P, Hodosy J, Behuliak M, et al. Oxidative and carbonyl stress in patients with obstructive sleep apnea treated with continuous positive airway pressure. *Sleep Breath* 2012; 16(2):393-398.
  220. Yagihara F, Lucchesi L, D'Almeida V, et al. Oxidative stress and quality of life in elderly patients with obstructive sleep apnea syndrome: are there differences after six months of Continuous Positive Airway Pressure treatment? *Clinics* 2012; 67(6): 565-571.



- 
221. Stradling J, Schwarz E, Schlatter C, et al. Bio-markers of oxidative stress following CPAP-withdrawal: data from two randomized trials. *The European Respiratory Journal*. 2015; 46(4): 1065-1071.
  222. Lavie L. Oxidative stress and inflammation in OSA. *Eur Resp Monograph* 2010; 50: 360e80.
  223. Baguet J, Barone-Rochette G, Tamisier R, et al. Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 2012; 9(12): 679–688. 15.
  224. Schulz R, Mahamoudi S, Hattar K, et al. Enhanced release of peroxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care* 2000; 162: 566–570.
  225. Garvey J, Taylor C, McNicholas W. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur Respir J* 2009; 33: 1195-1205.
  226. Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, et al. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 544-554.
  227. Drager L, Yao Q, Hernandez K, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 240-248.
  228. Cheng L, Khoo M. Modeling the autonomic and metabolic effects of obstructive sleep apnea: a simulation study. *Front Physiol*. 2012; 2: 111.
  229. Sforza E, Roche F. Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia* 2016; 4: 99-108.
  230. Kapur V. Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir Care* 2010; 55(9): 1155-1167.
  231. Arnardottir E, Mackiewicz M, Gislason T, et al. Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep* 2009; 32:447–470.
  232. Gozal D. Serum, urine, and breath-related biomarkers in the diagnosis of obstructive sleep apnea in children: is it for real? *Curr Opin Pulm Med*. 2012; 18: 561–567.
  233. Khalyfa A, Gileles-Hillel A, Gozal D. The Challenges of Precision Medicine in Obstructive Sleep Apnea. *Sleep Med Clin* 2016; 11(2):213-226.

- 
234. Shih J, Malhotra A. Could vitamins be helpful to patients with sleep apnea? *Chest* 2011; 139 (2): 237-238.
  235. Alvarado M, Roitz C. Relation of serum levels of C-reactive protein to anthropometric measurements; a systematic review of studies in South America. *Nutricion Hospitalaria* 2012; 27 (4): 971-977.
  236. Alam I, Lewis K, Stephens J, et al. Obesity, metabolic syndrome and sleep apnoea: all pro-inflammatory states. *Obesity Reviews* 2007; 8 (2): 119–127.
  237. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115 (5): 911–920.
  238. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, et al. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2013; 9 (10): 1003-1012.
  239. Guasti L, Marino F, Cosentino M, et al. Cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes in patients studied for suspected obstructive sleep apnea. *Sleep & Breathing* 2011; 15 (1): 3-11.
  240. Shamsuzzaman A, Amin R, Calvin A, et al. Severity of obstructive sleep apnea is associated with elevated plasma fibrinogen in otherwise healthy patients. *Sleep Breath* 2014; 18: 751-756.
  241. Saletu M, Nosiska D, Kapfhammer G, et al. Structural and serum surrogate markers of cerebrovascular disease in obstructive sleep apnea (OSA): Association of mild OSA with early atherosclerosis. *J Neurol* 2006; 253: 746-752.
  242. Ishida K, Kato M, Kato Y, et al. Appropriate use of nasal continuous positive airway pressure decreases elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 2009; 136: 125-129.
  243. Kohler M, Ayers L, Pepperell J, et al. Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial. *Thorax* 2009; 64(1): 67-73.
  244. Zhang X, Yin K, Wang H, et al. Effect of continuous positive airway pressure treatment on elderly Chinese patients with obstructive sleep apnea in the prethrombotic state. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 1426-1428.
  245. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362 (6423): 801-809.

- 
246. Pober J, Gimbrone Jr M, Lapierre L, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *Journal of Immunology* 1986; 137 (6): 1893-1896.
247. Amberger A, Maczek C, Jurgens G, et al. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress & Chaperones* 1997; 2 (2): 94-103.
248. Cofta S, Wysocka E, Dziegielewska-Gesiak S, et al. Plasma selectins in patients with obstructive sleep apnea. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2013; 756: 113-119.
249. Testelmans D, Tamisier R, Barone-Rochette G, et al. Profile of circulating cytokines: impact of OSA, obesity and acute cardiovascular events. *Cytokine* 2013; 62 (2): 210-216.
250. Chin K, Nakamura T, Shimizu K, et al. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med* 2000; 109 (7): 562-567.
251. Pak V, Keenan B, Jackson N, et al. Adhesion Molecule Increases in Sleep Apnea: Beneficial Effect of Positive Airway Pressure and Moderation by Obesity. *International Journal of Obesity* (2005) 2015; 39(3): 472-479.
252. Papanas N, Steiropoulos P, Nena E, et al. HbA1c is associated with severity of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome in nondiabetic men. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 751-756.
253. Sökücü S, Karasulu L, Dalar L, et al. Effect of hypoxia on glucose metabolism in nondiabetic patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Archivos de Bronconeumologia* 2013; 49 (8): 321-325.
254. Priou P, Le Vaillant M, Meslier N, et al. The IRSR Sleep Cohort Group. Independent association between obstructive sleep apnea severity and glycated hemoglobin in adults without diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35: 1902-1906.
255. Tokuda F, Sando Y, Matsui H, et al. Serum levels of adipocytokines, adiponectin and leptin, in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Internal Medicine* 2008; 47(21): 1843-1849.

- 
256. Mutairi S, Mojiminiyi O, Alawi A, et al. Study of Leptin and Adiponectin as Disease Markers in Subjects with Obstructive Sleep Apnea. *Disease Markers* 2014, Article ID 706314, 8 pages.
257. Garcia J, Sharafkhaneh H, Hirshkowitz M, et al. Weight and metabolic effects of CPAP in obstructive sleep apnea patients with obesity. *Respiratory Research* 2011, 12: 80-88.
258. Sánchez-de-la-Torre M, Mediano O, Barcelo A, et al. The influence of obesity and obstructive sleep apnea on metabolic hormones. *Sleep and Breathing* 2012; 16 (3): 649-656.
259. Yamamoto Y, Fujiuchi S, Hiramatsu M, et al. Resistin is closely related to systemic inflammation in obstructive sleep apnea. *Respiration* 2008; 76(4): 377-385.
260. Çuhadaro lu C, Utkusava A, Öztürk L, et al. Effects of nasal CPAP treatment on insulin resistance, lipid profile, and plasma leptin in sleep apnea. *Lung* 2009; 187(2): 75-81.
261. Shechter A. Effects of continuous positive airway pressure on energy balance regulation: a systematic review. *Eur Respir J* 2016; 48(6):1640-1657.
262. Alonso-Fernández A, García-Río F, Arias M, et al. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax* 2009; 64 (7): 581-586.
263. Pinto P, Bárbara C, Montserrat J, et al. Effects of CPAP on nitrate and norepinephrine levels in severe and mild-moderate sleep apnea. *BMC Pulm Med.* 2013, 13:13.
264. Jurado-Gámez B, Fernandez-Marin M, Gómez- Chaparro J, et al. Relationship of oxidative stress and endothelial dysfunction in sleep apnoea. *The European Respiratory Journal* 2011; 37 (4): 873-879.
265. Kotani K, Kimura S, Tsuzaki K, et al. Reduced paraoxonase1/arylesterase activity and its post-therapeutic increase in obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study. *Clinica Chimica Acta* 2008; 395 (1-2): 184-185.
266. Cintra F, Tufik S, D'Almeida V, et al. Cysteine: a potential biomarker for obstructive sleep apnea. *Chest* 2011; 139 (2): 246-252.
267. Svatikova A, Wolk R, Shamsuzzaman A, et al. Serum Amyloid A in Obstructive Sleep Apnea. *Circulation* 2003; 108: 1451-1454.

- 
268. Bu X-L, Liu Y-H, Wang Q-H, et al. Serum amyloid-beta levels are increased in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sci Rep* 2015; 5: 13917.
269. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol* 2004; 93: 439–53.
270. Zhou Y, Tang J, Wu M, et al. Effect of folic acid supplementation on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e25142.
271. Ford A, Garrido G, Beer C, et al. Homocysteine, grey matter and cognitive function in adults with cardiovascular disease. *PLoS One* 2012; 7: e33345.
272. Sobczak A, Wardas W, Zielinska-Danch W, et al. The influence of smoking on plasma homocysteine and cysteine levels in passive and active smokers. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 408-414.
273. Niu X, Chen X, Xiao Y, et al. The Differences in Homocysteine Level between Obstructive Sleep Apnea Patients and Controls: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95794.
274. Ryan S, Nolan G, Hannigan E, et al. Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity. *Thorax* 2007; 62 (6): 509-514.
275. Chen X, Niu X, Xiao Y, et al. Effect of continuous positive airway pressure on homocysteine levels in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath* 2014; 18(4): 687-694.
276. Araújo Freitas I, de Bruin P, Bittencourt L, et al. What can blood biomarkers tell us about cardiovascular risk in obstructive sleep apnea? *Sleep Breath*. 2015; 19(3): 755-768.
277. Wilkins M, Pasquali C, Appel R, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (NY)* 1996; 14: 61-65.
278. Mischak H, Apweiler R, Banks R, et al. Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1: 148-156.
279. Xu H, Zheng X, Jia W, et al. Chromatography/Mass Spectrometry-Based Biomarkers in the Field of Obstructive Sleep Apnea. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(40): e1541.

- 
280. Becker L, Kheirandish-Goza L, Peris E, et al. Contextualised urinary biomarker analysis facilitates diagnosis of paediatric obstructive sleep apnoea. *Sleep Med* 2014; 15: 541–549.
281. Zheng H, Li R, Zhang J, et al. Salivary biomarkers indicate obstructive sleep apnea patients with cardiovascular diseases. *Sci Rep* 2014; 4:7046.
282. Seetho I, Ramírez-Torres A, Albalat A, et al. Urinary proteomic profiling in severe obesity and obstructive sleep apnoea with CPAP treatment. *Sleep Sci.* 2015; 8(2):58-67.
283. Alexandre B, Charro N, Blonder J, et al. Profiling the erythrocyte membrane proteome isolated from patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease. *J Proteomics* 2012; 5 (76): 259-269.
284. Alexandre B. Proteomic mining of the red blood cell: focus on the membrane proteome. *Expert review of proteomics* 2010, 7: 165-168.
285. D'Alessandro A, Righetti P, Zolla L. The Red Blood Cell Proteome and Interactome: An Update. *J. Proteome Res* 2010; 9(1): 144–163.
286. Goodman S, Daescu O, Kakhniashvili D, et al. The proteomics and interactomics of human erythrocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238(5): 509-518.
287. Zappulla D. Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO<sub>2</sub> increases? *J Cardiometab Syndr* 2008; 3(1): 30-34.
288. Manta B, Hugo M, Ortiz C, et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2009; 484: 146-154.
289. Abugo O, Rifkind J. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium. *J Biol Chem* 1984; 269: 24845-24853.
290. George A, Pushkaran S, Konstantinidis D, et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood* 2013; 121: 2099-2107.
291. Gonzales R, Auclair C, Voisin E, et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1984; 44, 4137-4139.

- 
292. Nagababu E, Chrest F, Rifkind J. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1620, 211-217.
  293. Nagababu E, Mohanty J, Friedman J, et al. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Free Radic Res* 2013; 47: 164-171.
  294. Cao Z, Bell J, Mohanty J, et al. Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1494-H1503.
  295. Barodka V, Nagababu E, Mohanty J, et al. New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 52(4): 230-235.
  296. Huertas A, Das S, Emin M, et al. Erythrocytes induce proinflammatory endothelial activation in hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48: 78-86.
  297. Grau M, Pauly S, Ali J, et al. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability 2013. *PLoS ONE* 8:e56759.
  298. Nagababu E, Rifkind J. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 592-596.
  299. Farbstein D, Soloveichik Y, Levy N, et al. Genetics of redox systems and their relationship with cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13: 215-224.
  300. Fourquet S, Huang M, D'Autreaux B, et al. The dual functions of thiol-based peroxidases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and signaling. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1565-1576.
  301. Kilmartin J, Rossi-Bernardi L. Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates. *Physiol Rev* 1973;53(4): 836-890.
  302. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest* 2005; 115: 2099-2107.
  303. Fortu o A, San José G, Moreno M, et al. Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome. *Diabetes* 2006; 55: 209-215.

- 
304. Kinoshita A, Nakayama Y, Kitayama T, et al. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *FEBS J* 2007; 274: 1449-1458.
305. World Medical Association - Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Edimburgo, 2000.
306. Johns M. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991; 14 (6): 540-545.
307. Rechtschaffen A, Kales A, eds. A manual of standardised terminology, techniques and scoring systems for sleep stages of human subjects. Publication No. 204. Washington, National Institutes for Health, 1968.
308. Berry R, Budhiraja R, Gottlieb D, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med* 2012; 8: 597.
309. American Academy of Sleep Medicine Task Force (1999). Sleep-Related Breathing Disorders in Adults: Recommendations for Syndrome Definition and Measurement Techniques in Clinical Research. *Sleep* 1999, 22: 667-689.
310. American Academy of Sleep Medicine (2007). Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan S. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology, and technical specifications. Vol. 1. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
311. American Academy of Sleep Medicine (2000) International Classification of Sleep Disorders, Revised; Diagnostic and Coding Manual. American Academy of Sleep Medicine, Rochester, Minnesota, pp. 27-28.
312. American Academy of Sleep Medicine (2005). International Classification of Sleep Disorders. Sateia M., editor. Diagnostic and Coding Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Westchester (IL): American Academy of Sleep Medicine; 2005. pp. I-297.
313. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-419.
314. Antuna-Puente B, Disse E, Rabasa-Lhoret R, et al. How can we measure insulin sensitivity/resistance? *Diabetes Metab* 2011, 37: 179-188.



- 
315. Greenfield M, Doberne L, Kraemer F, et al. Assessment of insulin resistance with the insulin suppression test and the euglycemic clamp. *Diabetes* 1981; 30: 387-392.
  316. Wallace T, Levy J, Matthews D. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004; 27: 1487-1495.
  317. Levy J, Matthews D, Hermans M: Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diab Care* 1998, 21: 2191-2192.
  318. Gayoso-Diz P, Otero-González A, Rodriguez-Alvarez M, et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders* 2013, 13: 47.
  319. Huang D, Sherman B, Lempicki R. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4: 44–57.
  320. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 337-349.
  321. Halliwell B, Gutteridge J. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth edition. Oxford University Press Inc., New York.
  322. Wood Z, Schroder E, Harris J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40.
  323. Winterbourn C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 278-286.
  324. Perkins A, Nelson K, Parsonage D, et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* 2015; 40: 435–45.
  325. Rhee S, Woo H. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 781-794.
  326. Sies H. Role of Metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* 2014; 289: 8735–8741.
  327. Poole L. The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem* 2007; 44:61-81.

- 
328. Woo H, Yim S, Shin D, et al. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation for cell signaling. *Cell* 2010; 140: 517-528.
329. Peskin A, Low F, Paton L, et al. The High Reactivity of Peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in Its Reaction with other Oxidants and Thiol Reagents. *J Biol Chem* 2007, 282: 11885-11892.
330. Wood Z, Poole L, Hantgan R, et al. Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* 2002; 41: 5493–5504.
331. Wood Z, Poole L, Karplus P. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 2003; 300: 650-653.
332. Hall A, Karplus P, Poole L. Typical 2-Cys peroxiredoxins structures, mechanisms and functions. *Febs J* 2009; 276: 2469-2477.
333. Yang K, Kang S, Woo H, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem* 2002; 277: 38029-38036.
334. Lim J, Choi H, Park Y, et al. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J Biol Chem* 2008; 283: 28873-28880.
335. Hoyle N, O'Neill J. Oxidation–Reduction Cycles of Peroxiredoxin Proteins and Nontranscriptional Aspects of Timekeeping. *Biochemistry* 2015; 54, 2: 184–193.
336. Jang H, Lee K, Chietal Y. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 2004; 117 (5): 625-635.
337. Mokhlesi B, Ham S, Gozal D. The effect of sex and age on the comorbidity burden of OSA: an observational analysis from a large nationwide US health claims database. *Eur Respir J* 2016; 47: 1047–1049.
338. Peppard P, Young T, Barnet J, et al. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013; 177(9): 1006-1014.
339. Slater G, Pengo M, Kosky C, et al. Obesity as an independent predictor of subjective excessive daytime sleepiness. *Respir Med* 2013; 107 (2): 305–309.
340. Faeh D, Chiolerio A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 745–756.
341. Baszczuk A, Kopczynski Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease [Abstract]. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 579.

- 
342. Shenov V, Mehendale V, Prabhu K, et al. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of coronary artery disease. *Ind J Clin Biochem* 2014; 29(3): 339–344.
343. Konukoglu D, Serin O, Ercan M, et al. Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. *Clin Biochem* 2003; 36: 405–408.
344. Shaw J, Punjabi N, Wilding J, et al. Sleep-disordered breathing and type 2 diabetes: a report from the International Diabetes Federation Task force on Epidemiology and Prevention. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 81 (1): 2–12.
345. Wu H, Yuan X, Wang L, et al. The Relationship Between Obstructive Sleep Apnea Hypopnea Syndrome and Inflammatory Markers and Quality of Life in Subjects With Acute Coronary Syndrome. *Respir Care*. 2016; 61(9): 1207-1216.
346. Monneret D, Tamisier R, Ducros V, et al. Glucose tolerance and cardiovascular risk biomarkers in non-diabetic non-obese obstructive sleep apnea patients: Effects of long-term continuous positive airway pressure. *Respir Med* 2016; 112: 119-125.
347. Wang L, Li J, Xie Y, et al. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Biomed Environ Sci* 2010; 23(1): 42-47.
348. León Subías E, Gómara de la Cal S, Marin Trigo J. Red Cell Distribution Width in Obstructive Sleep Apnea. *Arch Bronconeumol*. 2017; 53 (3): 114-119.
349. Gong F, Hou G, Liu H, et al. Peroxiredoxin 1 promotes tumorigenesis through regulating the activity of mTOR/ p70S6K pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Medical Oncology* 2015; 32:25.
350. Kinnula V, Lehtonen S, Sormunen R, et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002; 196: 316-323.
351. Krapfenbauer K, Engidawork E; Cairns N, et al. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 2003; 967: 152-160.
352. Hattori F, Oikawa S. Peroxiredoxins in the central nervous system. *Subcell Biochem* 2007; 44: 357-374.
353. Rabilloud T, Berthier R, Vincon M, et al. Early events in erythroid differentiation: accumulation of the acidic peroxidoxin (PRP/TSA/NKEF-B). *Biochem J* 1995; 312: 699-705.

- 
354. Schroder E, Littlechild J, Lebedev A, et al. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 angstrom resolution. *Structure* 2000; 8: 605-615.
355. Low F, Hampton M, Peskin A, et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood* 2007; 109: 2611-2617.
356. Bayer B, Maghazal G, Stocker R, et al. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. *FASEB J* 2013; 27:3315-3322.
357. Matté A, Pantaleo A, Ferru E, et al. The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence. *Free Radic Biol Med* 2014;76: 80-88.
358. Park J, Lee S, Lee S, et al. 2-Cys Peroxiredoxins: Emerging Hubs Determining Redox Dependency of Mammalian Signaling Networks. *International Journal of Cell Biology* 2014, Article ID 715867.
359. Bast A, Wolf G, Oberbäumer I, et al. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2002; 45: 867-876.
360. Choi M, Lee I, Kim G, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 2005; 435: 347-353.
361. Poynton A, Hampton M. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1840: 906-912.
362. Woo H, Chae H, Hwang S, et al. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 2003; 300: 653-656.
363. El Eter E, Al Masri A, Habib S, et al. Novel links among peroxiredoxins, endothelial dysfunction, and severity of atherosclerosis in type 2 diabetic patients with peripheral atherosclerotic disease. *Cell Stress & Chaperones* 2014; 19 (2): 173–181.
364. Al-Masri A, El Eter E, Tayel S, et al. Differential associations of circulating peroxiredoxins levels with indicators of glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18 (5): 710-716.
365. El Eter E, Al-Masri A. Peroxiredoxin isoforms are associated with cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015; 48 (5): 465–469.

